De nuclealreactie van Feulgen en Rossenbeck en haar waarde voor de histologie

door

H. C. VOORHOEVE

AMSTERDAM
SCHELTEMA & HOLKEMA'S BOEKHANDEL
1926

DE NUCLEALREACTIE VAN FEULGEN EN ROSSENBECK EN HAAR WAARDE VOOR DE HISTOLOGIE

STELLINGEN.

I

Er bestaan geen redenen om aan te nemen, dat onder normale omstandigheden de milt een haemolyseerende werking uitoefent.

II

Toluyleendiamine werkt niet alleen in vivo, doch eveneens in vitro schadelijk op erythrocyten.

III

Steriliteit bij de vrouw kan berusten op sperma-immuniteit.

IV

Zwartwaterkoorts ontstaat als onmiddellijk gevolg van de werking van auto-haemolysinen.

V

In de aetiologie der hydroa aestivalis speelt de aanwezigheid van haematoporphyrine in het lichaam een groote rol.

VI

De meening, dat de geboorteleucocytose mechanisch zou tot stand komen door het leegdrukken der bloedbereidende organen gedurende de passage door de baringswegen, is onjuist.

VII

Vitale kleuring in den zin van kleuring van levende onbeschadigde celbestanddeelen is nooit aangetoond.

VIII

In tegenstelling met de opvatting van MUNK moet men aannemen, dat het voorkomen van dubbelbrekende lipoïeden in het sediment het bestaan van een acute nephritis niet uitsluit.

IX

De meening van HEUDORFER (Arch. f. Derm. u. Syph. 134), dat de beelden, welke men met de d.o.p.a. reactie verkrijgt, zouden overeenkomen met die, welke men na zilverkleuring ziet, moet als onjuist worden beschouwd.

De nuclealreactie van Feulgen en Rossenbeck en haar waarde voor de histologie

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. P. RUITINGA, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT OP DINSDAG 22 JUNI 1926, DES NAMIDDAGS TE $4^1/_2$ UUR, DOOR

HERMANUS CORNELIS VOORHOEVE
GEBOREN TE KEDIRI (JAVA)

AMSTERDAM
SCHELTEMA & HOLKEMA'S BOEKHANDEL
1926

Aan mijn vrouw.

Hoewel het verschijnen van dit proefschrift voor mij nog geen afscheid van de universiteit beteekent, neem ik de gelegenheid gaarne aan om U, hoogleeraren der medische en natuurphilosophische faculteiten te Amsterdam, mijn hartelijken dank te betuigen voor het tot dusver van U genoten onderwijs.

Hooggeleerde VAN REES, met dankbaarheid zal ik altijd terugdenken aan de aangename uren op Uw gastvrij laboratorium doorgebracht, en aan Uw vriendelijke belangstelling in mijn werk.

Hooggeleerde DE VRIES, dat een kritische beschouwingswijze voor wetenschappelijk onderzoek onontbeerlijk is, heb ik zeker in de eerste plaats op Uw colleges geleerd. Ik ben U daarvoor grooten dank verschuldigd.

Het was onder Uw leiding, hooggeleerde SCHÜFFNER, dat ik mijn eerste kennis omtrent de bloedmorphologie verkreeg. Daarvoor, en voor de gastvrijheid op Uw uitnemend laboratorium genoten, ben ik U zeer erkentelijk.

Het zijn vooral twee leermeesters geweest die een grooten invloed hebben uitgeoefend op mijn universitaire ontwikkeling. Vooreerst gij, hooggeleerde BUYTENDIJK, onder wiens leiding ik mijn eerste wetenschappelijke experimenten verrichtte. Uw voortdurende kritiek en belangstelling bij dat, voor den beginner zoo hachelijke werk, zullen onvergetelijk voor mij zijn.

En in het bijzonder gij, hooggeleerde WOERDEMAN, hooggeschatte promotor, aan wien ik in drieërlei opzicht veel verschuldigd ben. Vooreerst zijt ge voor mij geweest de geduldige leermeester, onder wiens leiding ik voor het eerst besefte dat histologie niet uitsluitend is morphologie, doch bovenal microphysiologie. Dit juist heeft het beoefenen der histologie voor mij zoo aantrekkelijk gemaakt. Ten tweede waart ge voor mij de beminnelijke chef, die zijn jongen assistent steeds met raad en daad ter zijde stond. En ten slotte hebt ge U bereid verklaard als mijn promotor op te treden; weest overtuigd dat Uw opbou-

wende kritiek en waardevolle raadgevingen bij het vervaardigen van dit proefschrift, en de vrijheid die ge mij bij mijn proeven gelaten hebt, mij steeds in dankbare herinnering zullen blijven.

Den beheerders van het STOKVIS-fonds, die mij in staat hebben gesteld ook in buitenlandsche laboratoria te werken, ben ik veel verplicht. Het persoonlijk kennis maken met werkwijzen en meeningen van buiten onze grenzen, is voor mij van onschatbaar voordeel geweest.

Esprimo anche là mia profonda gratitudine ai professori GIUSEPPE LEVI di Torino, TULLIO TERNI di Padova, ed al mio amico Dott. OLIVIERO OLIVO di Torino, pella loro grand' amibilita nel' insegnarmi la coltivazione dei tessuti in vitro, che sara per me di piu grand' importenza. L'hospitalita che loro mi hanno dimostrato nel laboratorio di Anatomia non ne potro mai dimenticare.

Aan allen die mij op eenigerlei wijze behulpzaam zijn geweest bij de samenstelling van dit proefschrift, zij ook langs dezen weg mijn welgemeende dank betuigd. Herrn Prof. Dr. R. DOHRN, Direktor der Zoologischen Station in Neapel, bin ich groszen Dank verpflichtet für die Liebenswürdigkeit womit er mir die verschiedenen Exemplare von Sphaeroma, Idothea, Strongylocentrotus lividus und Patella coeurulea geschickt hat. Aan Dr. L. DE BEAUFORT, directeur van het zoölogisch museum, Dr. J. G. A. REESER, directeur van het abattoir en aan den heer A. F. J. PORTIELJE, inspecteur van Artis, eveneens mijn hartelijke dank voor het materiaal dat ik van hen heb mogen ontvangen.

Niet het minst ben ik het personeel van het Histiologisch Laboratorium, in het bijzonder de heeren C. J. VAN DER STAD en J. RUYTER, erkentelijk voor de hulp en prettige samenwerking, welke ik bij het vervaardigen van dit proefschrift niet heb kunnen ontberen.

INHOUDSOPGAVE.

bladz.

HOOFDSTUK I.

Methoden ter onderscheiding van kern en protoplasma-bestanddeelen 1

HOOFDSTUK II.

De techniek der nuclealkleuring 16

HOOFDSTUK III.

De bestanddeelen der cellen welke een positieve nuclealreactie geven. 30
A. Resultaten door andere onderzoekers vrekregen. 30
B. Verschillende meeningen omtrent den bouw der kern 32
C. Eigen onderzoek 39
D. Het onderzoek op den kop van spermatozoën . . . 42
E. Zure en basische kernen 43
F. Conclusies en kritiek op andere in de literatuur voorkomende meeningen 44

HOOFDSTUK IV.

De nuclealreactie toegepast op degenereerende kernen. 53
A. Kerndegeneraties optredend in een nier met onderbonden circulatie 53
B. Degeneraties optredend aan kernen van witte bloedlichaampjes. 56
C. Degeneratieve kernveranderingen in een vogelsarcoom 58
D. De kernen in talkklieren en in de daarmee verwante klieren van MEIBOM en praeputiaalklieren . . 58
E. Celkernen in de klier van HARDER 60
F. Veranderingen aan de celkernen in de functioneerende mamma 61
G. Veranderingen aan de celkernen van het epididymisepitheel welke op een secretie zouden wijzen. . . 63

bladz.

H. Kernveranderingen in de epitheelcellen van den ductus deferens 64
I. Morphologische veranderingen aan de celkernen in de bekkenklier van salamanders gedurende de secretie 67
J. De celkernen in de giftklieren van Amphibia. . . . 70
K. De celkernen in de cementklier van Scalpellum . . 71
L. Kernveranderingen in de epitheelcellen van den tractus intestinalis bij Sphaeroma en Idothea. . 74
M. Veranderingen in de celkernen van rupsen gedurende de secretie 75
N. Het uittreden van nucleoli uit de celkern. 77

HOOFDSTUK V.

In cellen voorkomende structuren, van welke een herkomst uit de kern niet vaststaat 82
A. Het chromidiaalapparaat van GOLDSCHMIDT. . . . 82
B. De dooierkern in eicellen 91
C. De nevenkern in zaadcellen 96
D. Structuren in het protoplasma van sommige eicellen. 100
E. Protoplasmastructuren welke bij de verhoorning optreden 101
F. De lichaampjes van NISSL in ganglicecellen. 112
G. De genese van het melaninepigment 119
H. De korrels in mestcellen. 127
I. Structuren voorkomende in het protoplasma van kernlooze roode bloedlichaampjes 136
J. Bloedplaatjes 157

HOOFDSTUK VI.

Over het voorkomen van stoffen in het protoplasma, welke eveneens het zwaveligzure fuchsine kleuren, doch niet uit nucleïnezuur bestaan 159

HOOFDSTUK VII.

Samenvatting 167

GERAADPLEEGDE LITERATUUR 169

HOOFDSTUK I.

Methoden ter onderscheiding van kern- en protoplasmabestanddeelen.

Met de invoering der kleurstoffen in de histologische onderzoekingsmethoden (o.a. het karmijn door HARTING in 1854 en GERLACH in 1858, en vooral de anilinekleurstoffen door WEIGERT in 1875), leerde men niet alleen een nieuw onderscheid tusschen protoplasma en kern kennen, doch tevens bleken in deze laatste sommige bestanddeelen de kleurstof sterk aan te trekken, in tegenstelling met andere, welke ongekleurd bleven. Dit was aanleiding om in de celkern een scherp onderscheid tusschen beide bestanddeelen te maken: de kleurbare massa of het *chromatine*, en het *achromatische* gedeelte; waarbij dan het chromatine als het meest karakteristieke van de kern gold. Volgens de in 1880 door FLEMMING (van wien de naam chromatine afkomstig is) gegeven definitie: „Mit Chromatin soll nur bezeichnet werden diejenige Substanz im Zellkern, welche bei den als Kerntinktionen bekannten Behandlungen mit Farbstoffen die Farben aufnimmt", werden dus de netvormige kleurbare massa in de kern, benevens nucleolen en kernmembraan tot het chromatine gerekend.

Onderzoekingen van PAUL EHRLICH (1891),[1]) welke een verklaring voor het totstandkomen der kleuring ten doel hadden en vooral de samenstelling der kleurstoffen betroffen, brachten aan het licht, dat de verschillende kleurstoffen in twee groepen konden worden onderscheiden: de basisch- en de zuur reageerende. Sommige celbestanddeelen kleurden zich uitsluitend met de zure kleurstoffen, andere met de basische, weer andere met een neutrale verbinding van beiden. In zijn „Farbenanalytische

1) De tusschen haakjes geplaatste jaartallen verwijzen naar de literatuurlijst.

Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes" bleek het belang dezer ontdekking voor het herkennen van verschillendende soorten van witte bloedlichaampjes.

FLEMMING had bij zijn kleuringen met haematoxyline en aluinkarmijn naast een duidelijke kleuring van het chromatinenetwerk ook een zwakke kleuring van wat hij meende het kernsap te zijn, verkregen; dit kernsap was onder den invloed van het fixatief tot een korrelige massa gestold, en deze korreltjes namen nu in geringe mate de kleurstof op.

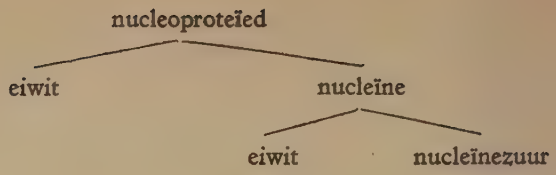
In 1890 verkreeg HEIDENHAIN bij kleuring volgens EHRLICH-BIONDI in zooverre andere beelden dan FLEMMING, dat zich thans het chromatinenetwerk met het basische methylgroen had gekleurd, de nucleolen en de korreltjes van het kernsap daarentegen met het zuurfuchsine. De eerste substantie noemde hij *basichromatine,* de beide laatste tezamen *oxychromatine*. Om twee redenen meende HEIDENHAIN te mogen besluiten, dat het hier een constante specifieke kleuring betrof: 1° omdat bij mitotische deelingen de chromosomen zich vanaf het vroegste spireemstadium uitsluitend met het methylgroen kleurden; 2° omdat bij chromatolyse, zooals dit vooral gezien werd in de cellen van de (voor het eerst door VON SIEBOLD beschreven) klieren in de cloacawand bij salamanders (de z.g. bekkenklieren), steeds een scheiding tusschen deze twee soorten chromatine plaats vond: het basichromatine verzamelde zich aan de periferie, het oxychromatine in het centrum der kern. Juist deze volkomen scheiding tusschen de beide soorten chromatine bewijst volgens HEIDENHAIN, dat men hier twee chemisch en biologisch verschillende substanties voor zich heeft. Door vergelijking van met ijzerhaematoxyline gekleurde kernen met die, welke volgens BIONDI behandeld waren, kwam hij tot de gevolgtrekking, dat de kern, behalve uit de kernmembraan en nucleolen, bestaat uit een sponsachtig netwerk, het lininenetwerk der vroegere onderzoekers: CARNOY (1884), in welks mazen twee soorten chromatinekorrels, basophiele en oxyphiele, zich bevonden, waarbij de eerste meestal in de grootere, de tweede in de kleinere mazen gelegen waren.

HEIDENHAIN meende ook, dank zij de physiologisch-chemische onderzoekingen over de kerneiwitten, in staat te zijn, gevolgtrekkingen te maken over de chemische geaardheid van het basi-

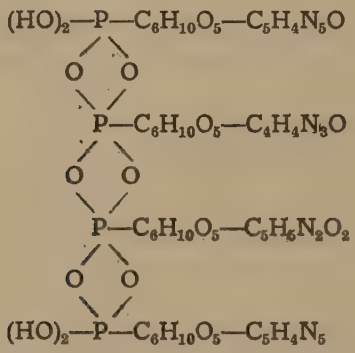
en oxychromatine. Deze physiologisch-chemische gegevens komen in het kort neer op het volgende:

De klassieke onderzoekingen van MIESCHER in 1869 over puscellen en van PLOSZ (1871) over roode bloedlichaampjes van vogels en slangen leerden, dat in de kern van genoemde cellen een eiwit voorkwam, door den eersten onderzoeker nucleïne genoemd, dat zich door onoplosbaarheid in water en zuren, oplosbaarheid in alkaliën en een hoog phosphorgehalte kenmerkte. Door HOPPE-SEYLER (1871) werd, na een bevestiging van MIESCHER's uitkomsten, kort daarop uit gistcellen een eiwit geïsoleerd, dat veel overeenkomst vertoonde met het genoemde nucleïne, waarvan hij zelfs de volgende qualitatieve en quantitatieve chemische analyse gaf: C_{43} H_{606} N_{1531} P_{258}. De aanwezigheid van den phosphor in het nucleïnemolecuul der gistcellen werd door LOEW bestreden; het zou slechts als verontreiniging van het te analyseeren materiaal dienen beschouwd te worden. KOSSEL (1882) onderwierp daarop het nucleïne, verkregen uit perssap van gistcellen, aan een nauwkeurig chemisch onderzoek, en kon vaststellen, dat het nucleïne, aan de inwerking van kokend water blootgesteld, uiteen viel in phosphorzuur, hypoxanthine en een eiwitachtig lichaam. De phosphor zou zeker afkomstig zijn van het nucleïne-molecuul en met verontreiniging niets te maken hebben.

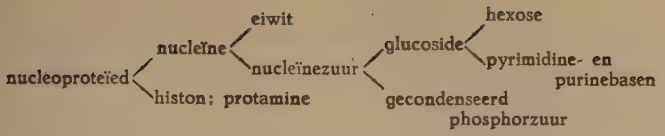
Wat het nucleïne der dierlijke celkernen betreft, zoo zijn het vooral onderzoekingen van MIESCHER, ALTMANN (1899) (die voor het eerst het nucleïnezuur aantoonde) en van KOSSEL en zijn leerlingen, van welke in het bijzonder STEUDEL moet worden genoemd, die onze kennis van de chemie dier eiwitten zeer uitgebreid hebben. Al deze onderzoekingen hebben geleerd, dat, wat men chromatine pleegde te noemen, bestaat uit nucleïne, waaraan een molecuul eiwit gebonden is, en waaraan daarom de naam nucleoproteïed werd toegekend; en dat het nucleïne op zijn beurt weer bestaat uit een nucleïnezuur gebonden aan een ander eiwitmolecuul, zoodat volgens KOSSEL en LILIENFELD (1887) het volgend schema voor de samenstelling der nucleoproteïeden kon worden gegeven:



Juist het nucleïnezuur is het voorwerp geworden van intensief chemisch onderzoek. Door steeds verder gaande splitsingen werden tenslotte stoffen verkregen van betrekkelijk eenvoudige chemische samenstelling; uit deze afbraakproducten en uit de eerder bepaalde empirische formule (C_{43} H_{61} N_{15} P_4 O_{34}) kon STEUDEL in 1912 voor het nucleïnezuur, door hem uit de thymus geïsoleerd en daarom thymonucleïnezuur genoemd, de volgende structuurformule opstellen:



Zooals uit deze formule te zien is, bestaat het thymonucleïnezuur uit een gecondenseerd phosphorzuur, waaraan vier glucosiden verbonden zijn, welke op hun beurt samengesteld zijn uit een hexose, waaraan respectievelijk één der basen guanine, cytosine, thymine en adenine bevestigd zijn. De wijze, waarop bij hydrolyse van het kerneiwit (nucleoproteïed) de verschillende splitsingsproducten ontstaan, kan aan de hand van het volgend schema verduidelijkt worden:



Voor het totstandkomen der histologische kleuring werd door HEIDENHAIN (1907) het vierbasische nucleïnezuur verantwoordelijk gesteld. Dit zuur toch zou uit den aard der zaak een affiniteit tot basische kleurstoffen bezitten, en met de kleurbasen hiervan zich tot gekleurde zouten binden. Het verschillend gedrag van basi- en oxychromatine ten opzichte van kleurstoffen zou daarop berusten, dat basichromatine uit phosphorrijke nucleïnen (dus uit veel nucleïnezuur, gebonden aan weinig ander eiwit), het oxychromatine daarentegen uit phosphorarme nucleïnen zou bestaan. Deze meening werd gegrond op proeven van MALFATTI (1892), waarbij nucleïnen met verschillend nucleïnezuurgehalte uit een mengsel van methylgroen en zuurfuchsine meer van de eerste en minder van de tweede kleurstof aantrokken, naarmate zij rijker aan nucleïnezuur waren.

De hypothese van HEIDENHAIN heeft alleen dan reden van bestaan, indien men tegelijkertijd het totstandkomen der kernkleuring als een chemisch proces beschouwt, d.w.z. wanneer men aanneemt, dat de kleuring tot stand komt door de vorming van een zout tusschen de kleurstofbase en het zure chromatine. Deze chemische theorie vindt haar aanhangers in LILIENFELD (1893), ROHDE (1903), PAUL MAYER (1897), e.a.. LILIENFELD (1893) meende zelfs bij kleuringen met methylgroen-zuurfuchsinemengsels aan de verschillende kleurnuanceeringen de verschillende nucleïnezuurverbindingen van elkaar te kunnen onderscheiden; nucleohiston zou zich groenblauw, nucleïne blauwgroen, en nucleïnezuur intensief groen kleuren. Ook ROHDE sloot zich bij HEIDENHAIN aan, en concludeerde uit het verschijnsel, dat het chromatine met joodgroen-fuchsinemengsels alle overgangen tusschen intensief en licht violet kon vertoonen, dat in de kernen nucleoproteïeden van zeer verschillend phosphorgehalte voorkomen.

Tegenover deze chemische theorie der kleuring stonden tal van andere opvattingen. Zoo leerde vooral ALFRED FISCHER (1899) in zijn uitvoerige monographie over „Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas", dat het totstandkomen eener kleuring aan physische wetten gebonden is. Eenzelfde eiwit, uit verschillend geconcentreerde oplossingen neergeslagen, bleek in die neerslagen granula van verschillende grootte te bezitten, waarvan zich de groote met basische, de kleine met zure kleurstoffen kleurden. Aan den anderen kant bleken twee, in chemisch opzicht zeer verschillende, stoffen als pepton en nucleïnezuur zich op dezelfde wijze en met dezelfde kleurstoffen te kleuren. FISCHER neemt aan, dat een kleuring tot stand komt door adsorptie van een kleurstof; de chemische samenstelling van het te kleuren voorwerp zou geen invloed op het verloop dezer adsorptie uitoefenen.

Door OTTO WITT (1890—'91) werd een theorie opgesteld, dat de kleurstof met het weefsel een vaste oplossing zou vormen, d.i. waarbij de kleurstof niet in een vloeibaar (zooals bij de gewone oplossingen), doch in een vast oplosmiddel (in dit geval het dierlijk weefsel) zou zijn opgelost. In dat geval zou echter de verdeeling der kleurstof tusschen vloeibaar en vast oplosmiddel moeten beantwoorden aan de door HENRY en BERTHELOT opgestelde verdeelingswet: $\frac{c}{c_1} = k$, waarbij dan de concentraties der kleurstof in beide oplosmiddelen zich volgens een bepaalde constante verhouden, hetgeen VON GEORGIEVICS (1912 en 1914) bij zijn onderzoekingen hierover niet kon vaststellen.

Nadat door de kolloiedchemici het verschijnsel der adsorptie aan een uitvoerig onderzoek was onderworpen, werd van verschillende zijden gepoogd (A. FISCHER, PELET JOLIVET, FREUNDLICH (1923), BILTZ, e.a.) het wezen der kleuring als een adsorptie te beschouwen. In overeenstemming met de wetten der adsorptie was, dat het weefsel aan een zwakke kleurstofoplossing relatief veel meer kleurstof onttrekt dan aan een sterke. En desnoods zou het beeld, hetwelk de histologische praeparaten bieden, in overeenstemming kunnen worden geacht met het wezen der adsorptie, waarbij alle kleurstof zich niet in het weefsel, doch slechts aan de oppervlakte er van dient te bevinden. Immers is

de dikte der microscopische preparaten gewoonlijk zoo gering, dat van een duidelijk verschil tusschen oppervlakte en inhoud veelal geen sprake is.

Tegen de adsorptietheorie pleiten echter onderzoekingen van HÖBER en zijn leerlingen over de z.g. vitale kleuring, waarbij bleek, dat voor een totstandkomen eener kleuring de kleurstof wel degelijk in de cel moet dringen, en dat de indringsnelheid, behalve van de geaardheid van het celoppervlak, in hooge mate afhankelijk was van den dispersiteitsgraad der kleurstof.

Nog onlangs heeft VON MÖLLENDORFF (1924) het resultaat van jarenlang onderzoek van zichzelf en zijn medewerkers over de theorie der kleuring van gefixeerde praeparaten in het licht doen verschijnen. Daarin meent hij alle kleuringen in twee groepen te kunnen verdeelen: 1° kleuringen, die tot stand komen door de vorming van een neerslag, hetgeen alleen bij basische kleurstoffen het geval kan zijn; 2° kleuringen, ontstaan door doordrenking met de kleurstof, welke zoowel bij basische als zure kleurstoffen kunnen optreden. Onder „basophilie" zou in het vervolg te verstaan zijn de eigenschap van bepaalde structuren om op hun oppervlakte neerslagen van basische kleurstoffen te voorschijn te roepen. Daarentegen is het begrip „oxyphilie" niet te omlijnen, aangezien bij doordrenkingskleuringen de diffusiesnelheid der kleurstoffen bij een bepaalde structuur een rol speelt.

Veel moeilijker nog is het probleem der *metachromasie* te verklaren, d.w.z. het verschijnsel, dat het weefsel een andere kleur heeft aangenomen dan die der gebruikte kleurstof. In een kortelings verschenen studie heeft JOSEF LEHNER (1924) kritiek uitgeoefend op de theorieën van FISCHER (metachromasie zou tot stand komen door verontreinigingen der gebruikte kleurstoffen), MICHAELIS (1902) (metachromasie berust op het bestaan van twee tautomere modificaties der metachromatische kleurstoffen), HANSEN (1898) (van de metachromatische kleurstoffen bezitten de kleurbasen een andere kleur als de kleurzouten, de door hydrolyse afgesplitste en in de oplossing in vrijen toestand aanwezige kleurbase veroorzaakt de metachromatische kleuring), en PAPPENHEIM (1901) (het zich metachromatisch kleurende weefsel veroorzaakt een splitsing der kleurbase en adsorbeert de anders

gekleurde carbinolbase) en de onhoudbaarheid van al deze theorieën aangetoond.

Van belang voor het metachromasievraagstuk zijn waarschijnlijk de kolloiedchemische onderzoekingen van SCHWARZ en HERMANN (1922). Deze beiden vonden, dat het optreden eener metachromatische kleur afhankelijk is van den dispersiteitsgraad van de te kleuren stof; eenzelfde stof (een kiezelzuurgel) nam, in fijn dispersen toestand, de kleur van de kleurstof aan, in grofdispersen toestand daarentegen de metachromatische. De schrijvers meenen dan ook, dat het totstandkomen eener metachromasie alleen beïnvloed wordt door den dispersiteitsgraad van het adsorbens.

Uit dit voorafgaande moge gebleken zijn, hoeveel tegenstrijdige meeningen er op het oogenblik over het totstandkomen der verschillende histologische kleuringen bestaan. Zeker is het in ieder geval, dat men niet gerechtigd is uit verschillen in kleur tusschen bepaalde celbestanddeelen chemische conclusies te trekken, zooals dit b.v. door UNNA (1887) gedaan wordt. Deze onderzoeker heeft in verschillende opstellen de meening verdedigd, dat methylgroen een elektieve nucleïnezuur-kleurstof zou zijn, want het zou zich alleen met nucleïnezuur binden, en de overige eiwitten (waartoe ook de andere, in de celkern aanwezige eiwitten behooren) in het geheel niet kleuren. Met zijn methylgroen-pyronine-methode zou het daarom mogelijk zijn de kernbestanddeelen in nucleïnezuur en overige eiwitten te scheiden.

De opvatting van UNNA berust op het verschijnsel, dat methylgroen, als zout van een ammoniumbase zeer resistent is, en slechts door een betrekkelijk sterk zuur, zooals wel in de kern, doch niet in het protoplasma voorkomt, in de kleurbase ontleed wordt. Afgezien nog van het feit, of werkelijk op deze wijze de kleuring tot stand komt, is het niet uitgesloten, dat ook in het protoplasma zuren van een zoodanige sterkte voorkomen, dat ook zij in staat zijn het methylgroen te ontleden. Om b.v. het volutine in schimmels voor een niet aan eiwit gebonden nucleïnezuur te houden, zooals SCHUMACHER (1925) dit doet, alleen, omdat het zich met een mengsel van methyleenblauw en phosphine

groen kleurt, terwijl nucleïnen en nucleoproteïeden een gele tint zouden aannemen, lijkt mij niet houdbaar.

Op andere wijze dan met kleurstoffen is daarom getracht kernbestanddeelen, en wel in hoofdzaak chromatine, van het overige celplasma te onderscheiden. Zoo hebben onderzoekingen van CARNOY, ZACHARIAS (1881 e.v.), SCHWARZ (1887), en in lateren tijd vooral van GROSZ (1917) met de z.g. „Lösungsanalytische Methode" bruikbare resultaten opgeleverd. Deze methode maakt gebruik van de eigenschap van bepaalde eiwitten om in bepaalde stoffen op te lossen. Zoo worden b.v. nucleoproteïeden van het chromatine (basichromatine van HEIDENHAIN) door een mengsel van zoutzuur en maagsap wel is waar gesplitst, o.a. in nucleïnezuren, doch deze worden dan niet verder afgebroken, terwijl de nucleolen onder deze behandeling eerst zwellen en vervolgens gedeeltelijk worden opgelost. In plaats van een mengsel van pepsine en zoutzuur kan men ook het z.g. „kunstmatig maagsap" voor dit doel gebruiken, bestaande uit een glycerineextract van een varkensmaag, waaraan een drievoudige hoeveelheid 0,28% HCl wordt toegevoegd. Wanneer dit maagsap gedurende 24 uur bij een temperatuur van $\pm$ 37° C op kernen heeft ingewerkt, ziet men de chromatinekorrels als sterk lichtbrekende, scherp gecontoureerde punten, terwijl van de nucleoli weinig meer te herkennen is.

Naast dit kunstmatig maagsap werden door ZACHARIAS nog verschillende andere stoffen (zuren, alkaliën, zouten) op hun werking op celbestanddeelen bestudeerd; wat de celkern betreft zijn deze proeven in hoofdzaak gedaan op koppen van zalmspermatozoën. Door PRATJE (1920) zijn de hierbij verkregen uitkomsten in de volgende tabel overzichtelijk gerangschikt:

	Chromatine	*Nucleolus*	*Rest van de kern*	*Protoplasma*
Kunstmatig maagsap pepsine — HCl	zwelt niet; wordt sterk lichtbrekend	zwelt; voor een deel opgelost	zwelt	zwelt; wordt niet opgelost
HCl 0.1—03 %	zwelt niet; sterk lichtbrekend	zwelt	zwelt	zwelt
HCl 60 %	opgelost	niet opgelost	niet opgelost	zwelt niet
Na Cl 10 %	zwelt	zwelt niet	zwelt niet	zwelt niet
$Na_2 SO_4$ 10 %	zwelt	zwelt niet	zwelt niet	zwelt niet
$Na_2 CO_3$ naar gelang v. concentratie	zwelt of wordt oplost	later als het chromatine opgelost	opgelost	zwelt of wordt opgelost
KOH ½ %	opgelost	later als chromatine gezwollen en opgelost	zwelt	opgelost
aq. dest.	zwelt zonder oploss.	zwelt niet	—	—
H_2O 100 Na_2SO_4 10 CH_3 COOH 1 fuchsine S 0,1	zwelt zonder kleuring	zwelt niet; roodkleuring	—	—
Methyleenblauw + fuchsine S (Na behandeling met 0,3 % HCl)	blauw	rood	rood	rood
methylgroen-azijnzuur	groen zonder zwelling	kleurt niet	kleurt niet	kleurt niet
azijnkarmijn van SCHNEIDER	rood zonder zwelling	zwelt zonder kleuring	geen kleuring	vage kleuring
ammoniakale karmijn oploss.	zwelt	zwelt niet; rood	—	—

Door SCHWARZ (1887) werd, naast de werking van verschillende andere stoffen, ook die van trypsine bestudeerd. Hier bleek nu juist het chromatine gemakkelijk verteerd te worden (meestal zelfs reeds na 5—10 minuten), terwijl de nucleoli zich veel resistenter toonden, tenslotte echter ook verdwenen.

	Chromatine	*Nucleolus*	*Rest van de kern*
Na Cl 10 %	oplosbaar	oplosbaar	oplosbaar
Na Cl 20 %	oplosbaar	onoplosbaar	zwellend
Mg SO_4 geconcentr.	oplosbaar	onoplosbaar	onoplosbaar
KH_2 PO_4 1—5 %	oplosbaar	onoplosbaar	onoplosbaar
KOH 0,1 %	oplosbaar	moeilijk oplosbaar	oplosbaar
CH_3 COOH 1 %	neergeslagen	neergeslagen	neergeslagen
CH_3 COOH 3 %	neergeslagen	zwellend	neergeslagen
HCl 0,1 %	onoplosbaar	onoplosbaar	onoplosbaar
HCl 1 %	onoplosbaar	zwellend,oplosb.	zwellend, onoplosb.
HCl geconcentr.	onoplosbaar	onoplosbaar	onoplosbaar
K_4 $Fe(CN)_6$ + CH_3 COOH	oplosbaar	neergeslagen	onoplosbaar
$CuSO_4$ geconcentr.	langzaam oplosb.	onoplosb. neergeslagen	onoplosb. neergeslagen
pepsine	niet verteerbaar	niet verteerbaar	niet verteerbaar
		gedeeltelijk opgelost	
trypsine	verteerbaar	gedeeltelijk	verteerbaar
		moeilijk verteerbaar	

Terwijl ZACHARIAS, SCHWARZ e.a. hun proeven op gefixeerd weefsel verricht hebben, zijn deze onderzoekingen eenige jaren geleden door GROSZ (1917) herhaald op levende cellen met resultaten, tegenstrijdig aan die van de voorgaande onderzoekers. Zoo vonden ZACHARIAS en CARNOY, dat de nucleoli in gefixeerde organen zich kenmerken door groote resistentie tegenover verdunde alkaliën, zuren en keukenzoutoplossingen, en door deze stoffen b.v. niet tot zwelling gebracht worden; bij de onderzoekingen van GROSZ op ongefixeerd weefsel bleken de nucleoli door genoemde reagentia wel degelijk opgelost te worden. Zoo hebben dan deze onderzoekingen de fundamenten ondermijnd, waarop tot nu toe de histochemicus nog met eenige zekerheid kon bouwen, en weer eens aangetoond, hoe voorzichtig de uitkomsten der microchemische kernonderzoekingen beoordeeld moeten worden.

Onder de rubriek der „Lösungsanalytische Methoden" vallen ook de onderzoekingen van Mej. Dr. M. A. VAN HERWERDEN (1915) over de werking van nuclease op celkernen.

In verschillende organen komt een enzym voor, dat in staat is nucleïnezuur af te breken. Voor het eerst is de methode om met behulp van dit enzym de kern af te breken door den botanicus OES in de microscopische techniek ingevoerd. Het gelukte hem met behulp van extracten uit planten kern en chromosomen uiteen te doen vallen. Door Mej. VAN HERWERDEN is deze methode voor de dierlijke histologie toegepast. Daarbij werd het nuclease volgens de methode van SACHS uit dierlijke organen, in hoofdzaak rundermilten, verkregen. Hiertoe wordt aan het perssap van een fijn gehakt orgaan ammoniumsulfaat toegevoegd, het ontstane neerslag gewasschen en gedroogd, en ter verwijdering van het ammoniumsulfaat gedialyseerd; het in den dialysator in oplossing gegane gedeelte bevat het nuclease. De al of niet gefixeerde coupes of organen worden gedurende 24 uur bij een temperatuur van 38° C. aan de werking van het nuclease blootgesteld.

Met behulp van deze methode is het Mej. VAN HERWERDEN gelukt in verschillende celstructuren de aanwezigheid van nucleïnezuur aan te toonen. Zoo bleken b.v. de basophiele korrels uit de eicellen van Strongylocentrotus lividus uit nucleïnezuurverbindingen te bestaan; hetzelfde gold van de basophiele lichaampjes van NISSL in de ganglicellen.

Bij deze nog uiterst primitieve middelen om met eenige zekerheid kernbestanddeelen onderling en van cytoplasma te onderscheiden, beloofden de onlangs verrichte onderzoekingen van FEULGEN en ROSSENBECK (1924) de groote leemte aan te vullen, die sinds jaren door vele histologen gevoeld was. FEULGEN en ROSSENBECK toch meenden over een methode te beschikken, om in histologische praeparaten het kernchromatine microchemisch aan te toonen. De theoretische beschouwingen, welke aan deze methode ten grondslag liggen, zijn de volgende:

Op blz. 4 is vermeld, dat het thymonucleïnezuur (en wellicht ook andere nucleïnezuren uit dierlijke cellen afkomstig) bestaat uit een gecondenseerd phosphorzuur, waaraan vier glu-

cosiden gebonden zijn en dat deze glucosiden weer opgebouwd zijn uit hexosen, waaraan zich pyrimidine- en purinebasen binden. Dat de glucosiden inderdaad uit een hexose opgebouwd waren, bleek uit de proeven van STEUDEL (1912); bij splitsing van thymonucleïnezuur met kokend zwavelzuur werden n.l. als splitsingsproducten van het koolhydraatcomplex mierenzuur en laevulinezuur aangetoond. Met deze methode was het echter niet mogelijk het reduceerend vermogen van de overeenkomende suiker aan te toonen. Dit gelukte eerst bij splitsing van het nucleïnezuur langs enzymatischen weg met behulp van het nuclease; na inwerking van dit enzym en na verwijdering der ontstane alloxuurbasen bleek de overblijvende vloeistof een positieve reactie van FEHLING te geven. Ook bij splitsing met salpeterzuur bleek deze reduceerende stof te ontstaan. Aan dit afbraakproduct, dat het phosphorzuur nog in organische verbinding bevat, het proefvocht van FEHLING krachtig reduceert en polarimetrisch onderzocht rechtsdraaiend is, gaven STEUDEL en BRIGL (1911) den naam thyminezuur, omdat deze stof zou overeenkomen met de door KOSSEL en NEUMANN (1896) bij inwerking van kokend water op nucleïnezuur verkregen thyminezuur. In dit zuur zijn volgens STEUDEL en BRIGL het thymine en cytosine nog aanwezig.

Door FEULGEN en zijn medewerkers is het reduceerend vermogen van het thyminezuur aan een nauwkeuriger onderzoek onderworpen. Daarbij bleek, dat dit, door hydrolyse van het uit hexosen opgebouwde thymonucleïnezuur (in tegenstelling met de pentosen bevattende nucleïnezuren uit gist, het guanylzuur uit het pancreas en het inosinezuur uit spieren) verkregen reduceerende thyminezuur, zich anders gedraagt dan de gewone suikers. Want dit thyminezuur vertoont alle eigenschappen van een aldehyd, d.w.z. het reduceert een ammoniakale zilveroplossing onder de vorming van een zilversol, en het geeft de door SCHIFF in 1866 ontdekte en naar hem genoemde reactie met zwaveligzure fuchsine. Indien n.l. door een fuchsineoplossing zwaveldioxyde wordt geleid, verdwijnt de violette kleur en ontstaat een kleurlooze of lichtgele vloeistof, doordat (volgens nieuwere onderzoekingen van WIELAND en SCHEUING) het fuchsineleukosulfonzuur gevormd wordt, hetwelk zich met een ander

molecuul zwaveligzuur tot een sulfinezuur verbindt. Met deze nieuwgevormde moleculen in de kleurlooze oplossing kunnen aldehyden nu een verbinding aangaan en daarbij een nieuwe sterk kleurende violette kleurstof vormen.

Aan het thyminezuur heeft FEULGEN den naam van *nucleal* gegeven (daarmee willende aanduiden, dat het afkomstig is van *nucle*ïnezuur en de eigenschappen van een *al*dehyd bezit) en de reactie hierop met fuchsinezwaveligzuur de *nuclealreactie* genoemd.

FEULGEN en ROSSENBECK zijn nu op de gedachte gekomen deze reactie ook microchemisch toe te passen, en wel door histologische praeparaten aan een lichte hydrolyse te onderwerpen en ze vervolgens gedurende eenigen tijd in een zwaveligzure fuchsineoplossing te dompelen. De eerste proeven zijn genomen op uitstrijkpraeparaten van kernhoudende roode bloedlichaampjes, welke door middel van hitte gefixeerd waren. Daarna hebben de onderzoekers hun proeven ook op weefsels uitgestrekt, door ze in sublimaat te fixeeren, tot paraffine coupes te verwerken en volgens hun methode te behandelen. Het bleek nu, dat zich met deze methode, zooals verwacht werd, alleen de kernen kleurden, niet het protoplasma, en dat de kernen geheel en al hetzelfde beeld vertoonden, alsof ze met een kernkleurstof gekleurd waren, m.a.w., dat zich met deze methode het chromatine kleurde, echter met dit verschil, dat bij de gewone histologische kleurmethoden de kleuring door onbekende factoren tot stand komt, terwijl met de nuclealreactie chemisch het thymonucleïnezuur in het chromatine wordt aangetoond.

Deze nieuwe nuclealreactie heeft in haar jong bestaan naast enkele enthousiaste voorstanders meerdere sceptici gevonden, die vooral willen waarschuwen tegen een kritiekloos gebruik maken dezer methode. Vooral in de in 1925 te Weenen gehouden jaarlijksche bijeenkomst der Duitsche anatomen is dit sterk uitgekomen. Terwijl VOSS zich onder de eerste groep onderzoekers rangschikt, het woord „chromatine", dit „Zwitterbegriff", zooals FICK het genoemd heeft, uit de histologie wil bannen en in zijn plaats den chemischen naam „nucleïne" invoeren, waarschuwen VON MÖLLENDORFF, PRATJE, REDENZ voor overhaaste conclusies, zoolang nog niet de waarde dezer reactie aan een kritisch onderzoek is onderworpen.

Onderzoekingen, welke na de eerste mededeeling van FEULGEN en ROSSENBECK verschenen zijn, hebben getoond, dat inderdaad niet alle celbestanddeelen, welke de reactie geven als uit nucleïnezuur bestaand mogen worden beschouwd, en, dat het omgekeerd zeer waarschijnlijk is, dat protoplasmabestanddeelen, welke zich met kernkleurstoffen behandeld als chromatine voordoen, deze reactie niet behoeven te geven. Zoo deelen de ontdekkers der methode zelf mede, dat ook in het protoplasma een stof voorkomt, welke positief reageert en met nucleïnezuur niets te maken heeft; aan deze stof, die het karakter van een lipoïed zou vertoonen, hebben zij den naam *plasmal* gegeven. Dit plasmal zou echter van nucleïnezuur te onderscheiden zijn door zijn positieve reactie zonder voorafgaande hydrolyse, terwijl het bij hydrolyse juist vernietigd zou worden. Dat echter ook dit onderscheid niet altijd opging, bleek uit hun onderzoek op elastische vezels, welke een plasmal zouden bevatten, dat hydrolyseeren kon verdragen zonder het vermogen van violetkleuring met zwaveligzure fuchsine in te boeten. Aan den anderen kant kon VOSS aan de lichaampjes van NISSL in ganglicellen, waarvan toch algemeen wordt aangenomen dat zij uit nucleïnezuur bestaan, geen duidelijke positieve reactie aantoonen.

Ik heb mij nu voorgesteld deze nieuwe nuclealreactie aan een nader onderzoek te onderwerpen, omdat m.i. deze methode, indien zij inderdaad in staat zou zijn het „chromatine" microchemisch aan te toonen, één van de belangrijkste aanwinsten zou zijn, welke de histologie in de laatste tientallen jaren gekend heeft.

Voor dit doel werd achtereenvolgens nagegaan:

1° in hoeverre kernbestanddeelen een positieve reactie geven,
   a. onder normale omstandigheden,
   b. bij kerndegeneratie, hetzij onder physiologische of pathologische omstandigheden verloopend.
2° in hoeverre protoplasmastructuren, waarvan door verschillende onderzoekers wordt aangenomen, dat zij uit kernbestanddeelen zijn opgebouwd, deze reactie vertoonen.
3° in hoeverre andere dan kernbestanddeelen deze reactie geven.

HOOFDSTUK II.

De Techniek der nuclealkleuring.

Volgens FEULGEN en ROSSENBECK wordt de nuclealreactie, toegepast op microscopische praeparaten, op de volgende wijze uitgevoerd:

De coupes van in sublimaat gefixeerde en in paraffine ingesloten organen worden door middel van xylol van hun paraffine bevrijd en door alcoholen van afnemende concentratie in water gebracht. Aan de alcoholen is wat dimethylhexandion (het „dimedon" der firma KAHLBAUM) tot een hoeveelheid van 1% toegevoegd, om de mogelijkerwijs in de alcoholen aanwezige aldehyden te binden. Voordat de praeparaten aan de hydrolysewerking worden blootgesteld, worden ze eerst in een 1 N zoutzuuroplossing (van kamertemperatuur) gespoeld. Uitstrijkpraeparaten worden in de hitte gefixeerd en dan onmiddellijk in deze zoutzuuroplossing gespoeld. Vervolgens wordt gehydrolyseerd in een 1 N zoutzuuroplossing bij 60° C gedurende 4 minuten. Er moet op gelet worden, dat tijdens de hydrolyse niet te veel water uit het bad verdampt; dit moet anders voortdurend aangevuld worden, zoodat het bad een constant volumen behoudt. Na de hydrolyse komen de praeparaten weer gedurende eenige seconden in de 1 N. zoutzuuroplossing van kamertemperatuur en worden dan gedurende 1—1$^1/_2$ uur in de zwaveligzure fuchsineoplossing gedompeld. Wanneer de coupes nu in water werden gebracht, zou dit een violetkleuring van de nog aanwezige zwaveligzure fuchsine, en daarmee een diffuse kleuring van het geheele praeparaat ten gevolge hebben. Om dit te voorkomen wordt de in het praeparaat, nog aanwezige zwaveligzure fuchsine met een vloeistof uitgewasschen, waarin zich zwaveligzuur en het daaruit ontwijkende zwaveldioxyde bevindt. Het

praeparaat wordt nu eerst driemaal in drie verschillende bekerglazen met zwaveligzure oplossing gespoeld en pas daarna in water gebracht. Daarna kan op de gewone wijze in canadabalsem ingesloten worden.

Kort samengevat wordt de methode dus als volgt uitgevoerd:

1° Ontparaffineeren der coupes in xylol.
2° Via 96% en 70% alcohol (waaraan dimedon tot 1% is toegevoegd) brengen in water.
3° Enkele seconden spoelen in 1 N. zoutzuuroplossing van kamertemperatuur.
4° Hydrolyseeren in 1 N. zoutzuuroplossing bij 60° C gedurende 4 minuten.
5° Spoelen in 1 N. zoutzuuroplossing bij kamertemperatuur.
6° Kleuren in zwaveligzure fuchsineoplossing gedurende 1—1½ uur.
7° Zorgvuldig spoelen in drie verschillende bekerglazen met zwaveligzuur oplossing, welke met I, II en III gemerkt zijn en steeds in deze volgorde worden gebruikt.
8° Spoelen in water.
9° Overbrengen achtereenvolgens in 70% alcohol, 96% alcohol, carbol-xylol, xylol; insluiten in canadabalsem.

De 1 N. HCl oplossing kan men zich verschaffen door aan 1 L. water 82,5 cc. geconcentreerd zoutzuur van een s. g. 1,19 (d.i. zoutzuur van 38%) toe te voegen.

De zwaveligzure fuchsine oplossing wordt op de volgende wijze bereid: Bij 200 cc. kokend water wordt 1 gr. fijn gewreven fuchsine gevoegd en door omschudden het in oplossing gaan bevorderd. Als de oplossing tot 50° C. is afgekoeld wordt ze gefiltreerd en het filtraat met 20 cc. 1 N. HCl oplossing gemengd. Het mengsel wordt onder de waterkraan tot 25° C. afgekoeld en hierin wordt dan 1 gr. fijngewreven droge zuivere natriumbisulfiet opgelost. Het geheel wordt bewaard in een flesch, welke door middel van een geslepen stop luchtdicht kan worden afgesloten. Na eenige uren is de vloeistof ontkleurd, doordat zich het uit het natriumbisulfiet en zoutzuur ontwikkelde zwaveldioxyde met het fuchsine tot het zwaveligzure-fuchsine heeft verbonden. Het is beter deze vloeistof niet onmiddellijk, doch eerst na 24 uur te

gebruiken. Indien in plaats van fuchsine S diamantfuchsine gebruikt wordt, behoudt de vloeistof een lichtgele kleur. Bereiding der SO_2-bevattende spoelvloeistoffen: Bij 200 cc. water wordt 10 cc. eener 10% oplossing van watervrij natriumbisulfiet en 10 cc. 1 N. zoutzuur gevoegd. Dit mengsel wordt over de drie bekers, welke luchtdicht moeten kunnen worden afgesloten, verdeeld.

Feulgen en Rossenbeck hebben zich streng aan deze voorschriften gehouden; steeds werd gedurende 4 minuten bij 60° C. gehydrolyseerd en gedurende 1—$1^1/_2$ uur gekleurd. Verder werden de proeven in hoofdzaak op in de hitte gefixeerde uitstrijkpraeparaten van kernhoudende roode bloedlichaampjes en pus uitgevoerd om den invloed van de in de histologie gebruikte fixatieven uit te schakelen; in die gevallen, waar zij hun proeven op weefsels betrokken, werd met sublimaat gefixeerd. Andere fixatieven, b.v. kaliumbichromaathoudende (vloeistof v. Zenker), werden niet beproefd, omdat de oxydeerende werking dezer stof wellicht van invloed kon zijn op den uitslag der reactie. En het formol, en mengsels hiervan met andere stoffen, kwamen natuurlijk in het geheel niet in aanmerking, omdat formol zelf een aldehyd is. Hoezeer de invloed dezer stof op het mislukken der kleuring gevreesd werd, blijkt uit hun uitlating: „Mit Formalin darf man in einem Laboratorium im dem die Nuclealfärbung ausgeübt wird am besten überhaupt nicht arbeiten, weil der Formaldehyd leicht flüchtig ist und die mit Formaldehyddämpfen erfüllte Luft die fuchsinschwefligsäure und die damit benetzten Präparate verderben kann".

Door Frieda Feulgen—Brauns (1924) is de methodiek der nuclealkleuring aan een uitvoeriger onderzoek onderworpen. In de eerste plaats onderzocht zij de optimale voorwaarden, waaronder de reactie tot stand kon komen, zooals het optimum der hydrolyse en het optimum der fuchsinzwaveligzuur-inwerking. In de tweede plaats de resistentie der nuclealkleuring; in de derde plaats de resistentie der stoffen, waaruit het nucleal is ontstaan en wel hun resistentie tegenover verschillende in de histologische techniek gebruikte fixatiemiddelen. Wat het eerste punt aangaat, zoo bleek, dat reeds na hydrolyse van 8 seconden (bij 60° C.) een,

zij het ook uiterst zwakke, kleuring der kernen van kikkerbloedlichaampjes in uitstrijkpraeparaten was opgetreden. In coupes waren na dit tijdsverloop de kernen der weefsels nog ongekleurd, die der erythrocyten in de vaten heel zwak; na 15 seconden, bij het hartspierweefsel na 30 seconden, begonnen zich de eerste te kleuren. Met verlenging van den hydrolysetijd ging een evenredige, sterkere kleuring gepaard, totdat een bepaald optimum na 4—5 minuten was bereikt. Bij langere blootstelling aan de zoutzuurwerking bleef de kleursterkte eerst constant, doch na 15 minuten hydrolyseeren was een vermindering in intensiteit waar te nemen, die bij nog langer durende hydrolyse steeds grooter werd. Met deze vermindering in intensiteit ging een kleiner worden der celkern, dus een substantieverlies, gepaard. Na 20—40 minuten vertoonden de kernen der verschillende weefsels geen reactie meer.

Een verandering der hydrolysetemperatuur bracht ook een verandering van den hydrolysetijd voor het bereiken van een optimumkleuring mee. Zoo werd het hydrolyse-optimum bij een temperatuur van 80° C. reeds na 1 minuut bereikt; bij een temperatuur van 40° C. na een uur, bij een temperatuur van 20° C. na 24 uren. Parallel met een daling van de zoutzuurconcentratie der hydrolysevloeistof ging een stijging van den hydrolyseduur. Het optimum der zwaveligzure fuchsine-inwerking werd bij alle onderzochte objekten na 1—1 $^1/_2$ uur bereikt, ofschoon reeds na 1 seconde een zwakke nuclealkleuring tot stand komt. De resistentie der kleuring bleek een zeer groote te zijn; zoowel door inwerking van physische (zonlicht) als chemische (zuren, alkaliën) invloeden trad een verkleuring slechts langzaam of in het geheel niet op.

De resistentie der nuclealvormers heeft de schrijfster tegenover verschillende in de histologische techniek gebruikelijke reagentia bepaald. Zoo b.v. tegenover oxydeerende stoffen als jodium en kaliumbichromaat. Tegen jodium waren deze eiwitten resistent; na kaliumbichromaatbehandeling (de organen werden in de vloeistof van ZENKER gefixeerd) trad daarentegen een minder intense kernkleuring op.

Eigen onderzoek.

In de reeks proefnemingen, welke hieronder volgen, en waarvan verschillende reeds verricht waren, voordat de mededeelingen van FRIEDA FEULGEN—BRAUNS (1924) mij bekend waren, werd getracht uit te maken, welken invloed een verschillend lange hydrolysetijd en welken invloed verschillende fixatievloeistoffen op de uitkomst der nuclealreactie hadden. Vooral echter werden proeven verricht, welke zouden moeten nagaan of de nuclealreactie, zooals zij door haar ontdekkers wordt uitgevoerd, inderdaad een microchemische reactie is; of wellicht ook zij niet op hetzelfde principe der gewone histologische kleurmethoden zou berusten.

Wat de duur der hydrolyse en kleuring betreft, zoo komen mijn uitkomsten geheel overeen met die van FEULGEN en ROSSENBECK en FRIEDA FEULGEN—BRAUNS; de beste resultaten werden verkregen, indien het weefsel bij 60° C. gedurende 4—5 minuten werd gehydrolyseerd en gedurende 1—1$^1/_2$ uur aan de inwerking van het fuchsinezwaveligzuur werd blootgesteld. Tenminste, dit geldt voor die celbestanddeelen, die *zonder eenigen twijfel* als celkern of als afkomstig van de celkern mogen worden beschouwd. Onderzoekingen van REDENZ (1925), welke opleverden, dat de lichaampjes van NISSL in gangliecellen wel een positieve nuclealreactie geven, mits bij lagere temperatuur wordt gehydrolyseerd, maakten het noodzakelijk bij alle weefsels verschillende hydrolysetemperaturen en hydrolysetijden toe te passen. In het bijzonder bij die weefsels, welke structuren bevatten, waarover de meeningen nog sterk uiteen loopen, of zij van het kernchromatine afkomstig zijn (en dus nucleïnezuur bevatten), of slechts als bijzondere differentiatie van het protoplasma moeten worden beschouwd. Zoo werden bij alle onderzochte weefsels de volgende combinaties van hydrolysetemperatuur en hydrolyseduur toegepast:

18° C. → 1 u.; 3 u.; 8 u.; 12 u.; 18 u.; 24 u.
40° C. → 3 min.; 8 m.; 30 m.; 1 u.; 3 u.
50° C. → 1 m.; 3 m.; 5 m.; 30 m.; 1 u.
55° C. → 1 m.; 2 m.; 3 m.; 5 m.; 10 m.; 15 m.; 30 m.
60° C. → 1 m.; 2 m.; 3 m.; 4 m.; 10 m.; 15 m.; 30 m.

Evenals Frieda Feulgen—Brauns vond ook ik, dat lagere hydrolysetemperatuur gepaard moest gaan met een evenredig langeren hydrolysetijd om hetzelfde kleureffect te bereiken. Zoo komt een hydrolyse bij 18° C. gedurende 24 uur overeen met een hydrolyse bij 60° C. gedurende 4 min., en deze weer met een hydrolyse bij 55° C. gedurende 10 min. Een langere kleuringsduur dan 1—$1^1/_2$ uur is volstrekt overbodig. Praeparaten, die ik 5 uur in het kleurbad had gelegd, vertoonden volkomen hetzelfde beeld als die, welke er slechts 1 uur in hadden gelegen.

Als zoutzuurconcentratie van het bad waarmee gehydrolyseerd wordt is door Feulgen en Rossenbeck aangegeven: 1 normaal. Uit mijn proeven bleek mij, dat een sterkere concentratie gepaard gaat met sneller verloopende hydrolyse. Een praeparaat, dat slechts enkele seconden aan de inwerking van een geconcentreerde (38%) oplossing van zoutzuur bij 60° C. is blootgesteld geweest, vertoont geen nuclealreactie meer. Ook een oplossing van 18% zoutzuur oefent dezelfde werking uit. Niet alleen, dat de praeparaten geen nuclealreactie meer geven, ook na kleuringen met haematoxyline en eosine is onder deze omstandigheden van kernen niets te bespeuren. De opgave van Schwarz, dat chromatine in een geconcentreerde zoutzuuroplossing onoplosbaar zou zijn (men zie de tabel op blz. 11) heb ik bij mijn proeven niet kunnen bevestigen.

In het bijzonder moet hier de nadruk worden gelegd op een goede uitspoeling in zwaveldioxyde-houdend water na kleuring met fuchsinezwaveligzuur. Reeds is meegedeeld, dat een onmiddelijke spoeling der praeparaten in water een diffuse roodkleuring ten gevolge heeft. Het overtollige, in het weefsel aanwezige, zwaveligzure-fuchsine moet eerst door het SO_2-houdend water zijn weggespoeld, voordat de coupes met gewoon water in aanraking komen. Bij niet-compact gebouwde weefsels is dit gemakkelijk te verkrijgen, en een spoeling van 2—3 minuten is hiervoor reeds voldoende. Anders is dit gesteld bij compact gebouwde weefsels, zooals kraakbeen en been. Daartoe is een goede uitspoeling gedurende een tien- tot vijftiental minuten in zwaveldioxyde-houdend water noodzakelijk. Door het verzuimen van dezen regel ben ik in het begin van mijn proefnemingen slachtoffer geworden van verkeerde uitkomsten bij het onderzoek van

beenweefsel en vooral van tandbeenweefsel. Bij een vluchtige spoeling, zooals ik in het begin deed, werd steeds een diffuse kleuring van dit weefsel verkregen, en ik meende reeds te moeten besluiten, dat deze weefsels een positieve nuclealreactie geven, toen een wat langer durende uitspoeling negatieve uitkomsten gaf. Het bleek mij toen, dat, indien slechts intensief genoeg gespoeld wordt, been en tandbeen nimmer een positieve nuclealreactie geven. Nucleïnezuurhoudende bestanddeelen, die zich met het zwaveligzuur gekleurd hebben, laten zich daarentegen door het SO_2-houdend water niet in het minst beïnvloeden. De celkernen van praeparaten n.l., welke gedurende eenige dagen in een bad van zwaveldioxyde-houdend water waren geplaatst, vertoonden niet het minste verschil met die van op de gewone wijze behandelde contrôlepraeparaten. Na deze opgedane ervaring werd in het vervolg bij elke positieve uitkomst van een bepaalde structuur de kleuring steeds herhaald en een intensieve spoeling met SO_2-houdend water ingelascht.

Het is gewenscht de verschillende reagentia steeds tijdig te ververschen; zoowel het zoutzuurbad, waarin gehydrolyseerd wordt, als de zwaveligzuurfuchsineoplossing en de baden met het SO_2-water. Het kleurbad moet of geheel kleurloos (bij gebruik van fuchsine S.) of lichtgeel getint zijn (bij gebruik van diamantfuchsine), en mag geen spoortje van een roode of violette kleur bevatten. De vaten met het spoelwater moeten sterk naar zwaveldioxyde rieken (prikkelende werking op het reukslijmvlies).

Door Feulgen en Rossenbeck werd, ter voorkoming van complicaties, alleen het sublimaat als fixatief voor weefsels toegepast. Frieda Feulgen—Brauns heeft den invloed van verschillende fixatieven, waaronder kaliumbichromaathoudende mengsels, op den uitslag der nuclealreactie onderzocht, en hier eveneens goede resultaten mee verkregen, zij het ook, dat het kaliumbichromaat de kleuring iets verzwakte.

Met het oog op het onderzoek van verschillende structuren, die slechts met een bepaald fixatief te fixeeren zijn (zoo blijven b.v. de granula der leucocyten in de fixatievloeistoffen van Orth of Helly het best behouden; de zilverkleuring ter aantooning van de voorstadia van het melaninepigment is slechts op weefsels,

welke in de vloeistof van BOUIN gefixeerd zijn, te verrichten; enz.) was de bestudeering van den invloed der meest verschillende fixatiemiddelen op het totstandkomen der nuclealkleuring een vereischte. Naast den invloed van oxydeerende en reduceerende chemicaliën, was vooral de invloed van het formaline, de stof, waarvoor FEULGEN en zijn medewerkers zich zoo bevreesd toonen, op den uitslag der reactie, een probleem, dat mij bijzonder belang inboezemde. De invloed der volgende fixatievloeistoffen werd nagegaan:

A. *Vloeistoffen die geen formol bevatten.*
   1° sublimaat in verzadigde waterige oplossing.
   2° sublimaat-azijnzuur volgens LANG.
   3° sublimaat-alcohol volgens APATHY.
   4° absolute alcohol.
   5° alcohol-azijnzuur.
   6° fixatief van CARNOY.
   7° trichlooraziJnzuur.
   8° „subtrie" van HEIDENHAIN.
   9° fixatief van HOFKER.
   10° vloeistof van ZENKER.
   11° vloeistof van MÜLLER.
   12° fixatief van KINGSBURY.
   13° osmiumzuur.
   14° fixatief van FLEMMING.
   15° vloeistof van CHAMPY.
   16° vloeistof van CHURA.

B. *Formolhoudende vloeistoffen.*
   1° formol (10% formol = 4% formaldehyde).
   2° alcohol-formol.
   3° sublimaat-formol.
   4° „susa" volgens HEIDENHAIN.
   5° vloeistof van ORTH.
   6° vloeistof van HELLY.
   7° fixatief van MAXIMOW.
   8° fixatief van ROMEIS.
   9° vloeistof van BOUIN.
   10° vloeistof van HOLLANDE.
   11° vloeistof van KOPSCH.

Als resultaat van deze onderzoekingen kan ik meedeelen: *Geen der fixatieven, behalve het osmiumzuur en de osmiumzuurhoudende mengsels (vloeistoffen van* Flemming *en* Champy*) vormen een belemmering voor het totstandkomen der reactie.* Deze laatste groep van fixatieven schijnt zulke veranderingen in de samenstelling der nucleoproteïeden teweeg te brengen, dat bij hydrolyse geen nucleal gevormd wordt.

De mededeeling van Frieda Feulgen—Brauns, dat kaliumbichromaat een verzwakking der kleuring zou geven, heb ik niet kunnen bevestigen; wel werd in sommige, met dit zout gefixeerde, praeparaten een zwakkere kleur aangetroffen, doch andere, op dezelfde wijze behandelde, weefsels vertoonden even duidelijk gekleurde celkernen als diegene, welke in niet-kaliumbichromaathoudende vloeistoffen waren gefixeerd. Organen in formol of formolhoudende mengsels gefixeerd geven een elektieve kernkleuring zonder meekleuring van het overige weefsel, mits zij na fixatie in stroomend leidingwater worden gespoeld. De duur dezer spoeling is voor verschillende weefsels een verschillende; voor zeer los gebouwde kan men met eenige uren volstaan, voor compacte (beenweefsel) moet de spoeling 24—48 uur duren. Worden deze voorzorgsmaatregelen in acht genomen, dan verkrijgt men een duidelijke chromatinekleuring, welke bij die in andere vloeistoffen (uitgezonderd het osmiumzuur) gefixeerde weefsels in niets ten achter staat. Hiermee is het mogelijk geworden ook de met bepaalde fixatieven (vloeistoffen van Bouin en Hollande) duidelijk optredende kernstructuren, de slechts op een bepaalde wijze te fixeeren mitochondriën, de granula der witte bloedlichaampjes, het propigment in melanophoren, in de rij der onderzoekingen op te nemen.

In bijna alle gevallen werden de organen in paraffine ingesloten. Waar het moeilijk te snijden weefsels gold (huid; series door embryonen enz.) werd van de celloidine-paraffine-inbedding met methylbenzoaatcelloidine volgens Pĕterfi gebruik gemaakt. Daartoe komen de organen uit den absoluten alcohol gedurende 24—48 uur in de methylbenzoaat-celloidine oplossing (1 gr. celloidine opgelost in 100 cc. methylbenzoaat); vervolgens in chloroform en daarna insluiting in paraffine.

Het celloidine oefent op den uitslag der nuclealreactie geen schadelijken invloed uit.

Al geeft de methode van PÉTERFI, toegepast op moeilijk te snijden objecten, betere resultaten dan de gewone paraffine-inbedding, in enkele gevallen, waar het geldt het snijden der harde chitinehuid van lagere dieren, schiet ook zij tekort. In die gevallen heb ik met succes gebruik gemaakt van het eerst kortelings door ERICH SCHMIDT in de histologische techniek ingevoerde *diaphanol*. Dit diaphanol, bereid door de KÖLLN—ROTTWEIL AKTIENGESELLSCHAFT en verkrijgbaar bij de firma LEITZ te Berlijn, zou in staat zijn harde objecten (been, chitine, enz.) zoodanig te verweeken, dat het snijden er van tot coupes geen bezwaren meer zou opleveren, terwijl alle structuren in het weefsel aanwezig volkomen behouden zouden blijven. Bovendien oefent het een ontkleurende werking uit op aanwezige pigmenten. De gunstige resultaten, welke MAX CLARA met deze stof bij zijn onderzoek over den bouw der lamellair gebouwde zenuweindlichaampjes in de snavel der snip verkreeg, was aanleiding dat ik, op raad van Prof. WOERDEMAN, haar ook bij mijn onderzoek toepaste.

Diaphanol is een gele, rookende, sterk naar salpeterzuur riekende vloeistof, waarin de organen een meer of minder langen tijd verblijven, tot zij de gewenschte weekheid en verkleuring (bij pigmentrijke weefsels) hebben bereikt. Deze tijd schommelt tusschen 4—24 uur. De uitkomsten, die ik bij het gebruik dezer vloeistof verkregen heb, rechtvaardigen volkomen de door de firma gedane aanprijzingen. Harde weefsels worden goed snijdbaar, terwijl de kleurbaarheid der verschillende structuren behouden blijft; niet alleen voor verschillende in de histologie gebruikelijke kleurmethoden, doch ook voor de nuclealreactie. De invloed, dien het diaphanol op verschillende celstructuren zou kunnen uitoefenen, werd n.l. bestudeerd door *coupes* van organen aan de inwerking er van bloot te stellen en te vergelijken met coupes van hetzelfde orgaan, die met het diaphanol niet in aanraking waren geweest. Na langdurige diaphanolinwerking treedt alleen een zwakke hydrolyse van het, in het chromatine aanwezige, nucleïnezuur op, zoodat coupes, die 30 uur in de vloeistof hadden gelegen, zonder zoutzuurhydrolyse een zwakke violetkleuring

der celkernen met fuchsinezwaveligzuur geven. In het algemeen echter kan men na diaphanolinwerking den gewonen hydrolysetijd van 4—5 min. toepassen; het blijkt dan, dat de kernen hetzelfde uiterlijk hebben behouden, als vóór de diaphanolinwerking.

Er werd verder nog nagegaan in hoeverre het chromatine van praeparaten, die bloot hadden gestaan aan de inwerking van nuclease, nog reageerden op het nuclealreagens van FEULGEN.

Bereiding van het nuclease:

Deze werd, in navolging van Mej. VAN HERWERDEN (1915) uit de rundermilt met behulp der methode van SACHS bereid. Fijn gesneden stukjes milt werden in een vleeschmolen gemalen en daarna aan de inwerking van een koudmakend mengsel blootgesteld. Bij de proeven van SACHS en Mej. VAN HERWERDEN werden de miltstukjes in de pers van BUCHNER fijngeperst. Aangezien ik over zoo'n pers niet te beschikken had, poogde ik door stukvriezen van de cellen, het in die cellen aanwezige nuclease te verkrijgen; een methode die mij bij een vroeger onderzoek over de milt goede diensten had bewezen [1]). Het koudmakend mengsel bestond uit ijs + keukenzout, waarmede temperaturen van —17° C. werden bereikt. De miltmassa bleef hierin tot zij tot een harde geelbruine (door de aanwezige witte ijsnaaldjes) substantie was veranderd. Daarna werd ontdooid en gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof gedecanteerd en hieraan een verzadigde ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd; dan gefiltreerd. Het filterresidu werd gedurende 24 uur gedialyseerd; de in den dialysator achterblijvende vloeistof bevat het nuclease.

Om de inwerking van het nuclease op het nucleïnezuur van het kernchromatine te bestudeeren, werden gefixeerde coupes van organen, of stukjes ongefixeerd of in alcohol gefixeerd ovarium van een kikvorsch gedurende verschillenden tijd in de nuclease oplossing bij 38° C. geplaatst. Het blijkt uit deze proefnemingen, dat het nuclease dezelfde werking op de kern uitoefent, als de 1 N. zoutzuur oplossing bij 60° C., doch slechts in veel geringere mate. Een inwerking van het nuclease van ongeveer 10 uur komt overeen met een zoutzuurhydrolyse van 4 minuten bij 60° C.

1) Men zie VOORHOEVE 1923.

De praeparaten kunnen dus, na met nuclease behandeld te zijn, direct in de zwaveligzure fuchsineoplossing worden geplaatst. Is de nuclease-inwerking te gering geweest, dan kan daarna nog gedurende korten tijd met zoutzuur worden gehydrolyseerd; hebben de praeparaten te lang in de nucleaseoplossing gelegen (30 uur), dan geven de kernen nog slechts een zwakke nuclealkleuring.

Al steunt de microchemische nuclealreactie, zooals zij toegepast wordt op histologische praeparaten, ook op zuiver chemische onderzoekingen in vitro over het nucleïnezuur, zoo zou het toch aan den anderen kant mogelijk zijn, dat onder invloed van het zwaveligzure fuchsine primair in het protoplasma der cellen een kleurstof wordt gevormd, en dat eerst secundair deze kleurstof door de kern wordt aangetrokken, op dezelfde wijze als dit met kernkleurstoffen bij de gewone histologische kleurmethoden geschiedt. M. a. w., de methode van FEULGEN en ROSSENBECK zou geen chemische reactie op nucleïnezuur zijn, doch zich in niets van een gewone kernkleuring onderscheiden. Proeven van CHRZONSZCZEWSKY (1864) en R. HEIDENHAIN (1874) leeren immers, dat na inspuiting van indigozwavelzure natrium bij een proefdier, het protoplasma der cellen van de tubuli contorti en dikke deelen van de lis van HENLE in de nier zich vitaal kleurt, terwijl de kernen ongekleurd blijven. Wordt het orgaan echter gefixeerd, dan ziet men, dat de oorspronkelijk vitaal gekleurde cellen nu een ongekleurd of weinig gekleurd protoplasma, doch een duidelijk gekleurde kern bezitten. De verklaring hieraan gegeven is, dat op het oogenblik, waarop de cel door het fixatief beschadigd wordt, alle kleurstof door de kern aan het celplasma wordt onttrokken. Een dergelijk verloop der kleuring zou ook bij de nuclealreactie kunnen plaats hebben. Dat er in het celplasma inderdaad stoffen voorkomen, welke zich met het zwaveligzure fuchsine kleuren, zal in hoofdstuk VI nog nader worden uiteengezet.

Deze opvatting verliest veel aan waarschijnlijkheid door proeven, welke FEULGEN en VOIT (1924) bij de eencellige *Nyctotherus* uit den kikvorschdarm hebben verricht. Het bleek, dat in het protoplasma dezer dieren een stof voorkomt (het z.g. plasmal), dat zich met het fuchsinezwaveligzuur kleurt, zoowel na hy-

drolyse als zonder voorafgaande blootstelling aan de zoutzuurinwerking. Indien de gefixeerde dieren nu niet gehydrolyseerd werden en behandeld met het zwaveligzure fuchsine, kleurde zich het protoplasma intens, terwijl de kern ongekleurd bleef.

De volgende proeven bewijzen eveneens de onjuistheid van de genoemde veronderstelling. Dat de kleuring der kern tot stand komt zonder medewerking van het protoplasma toonen de drie eerste proeven:

1° Uitstrijkpraeparaten van kikkerbloed worden vóór het fixeeren met water behandeld waardoor haemolyse optreedt. Daarna worden de overgebleven kernen en stromata door hitte gefixeerd en volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandeld. De kernen kleuren zich op dezelfde wijze als die van normale roode bloedlichaampjes.

2° Eenige druppels kikkerbloed worden in water opgevangen, het mengsel gecentrifugeerd en gedecanteerd. Van de op den bodem liggende celoverblijfselen worden uitstrijkpraeparaten gemaakt en hierop de nuclealreactie verricht. Dezelfde uitkomst wordt verkregen als sub. 1 genoemd.

3° Onder den microscoop wordt het verloop der nuclealkleuring nagegaan. Bij gehydrolyseerde praeparaten (van lever, kraakbeen, bindweefsel) wordt een druppel der zwaveligzure fuchsine oplossing gebracht, hierop een dekglas geplaatst en microscopisch het totstandkomen der kleuring vervolgd. Het blijkt, dat na eenige minuten een zwakke violetkleuring der kernen optreedt, welke steeds meer in intensiteit toeneemt. Van een kleuring van het protoplasma is niets te bespeuren.

Dat de nuclealkleuring verschilt van een histologische kleuring, welke tot stand zou kunnen komen door binding van een elders gevormde kleurstof aan de kern, bewijst de volgende proef: Bij een oplossing van formaldehyd worden eenige druppels zwaveligzure fuchsine gevoegd, waardoor een gekleurde oplossing ontstaat van een soortgelijke kleurstof als door het nucleal uit het genoemde reagens zou worden gevormd. In deze kleurstofoplossing worden praeparaten met en zonder voorafgegane hydrolyse geplaatst. Het blijkt, dat van beide groepen zoowel het protoplasma als de celkern gekleurd wordt, de laatste sterker dan het eerste. Terwijl nu de celkernen van volgens FEULGEN

behandelde praeparaten hun kleurstof in zwaveldioxyde-houdend water niet afstaan (proeven werden verricht waarbij dergelijke coupes verscheidene dagen aan de inwerking er van werden blootgesteld) ontkleuren de op histologische wijze behandelde praeparaten zoowel in gewoon water als in zwaveldioxyde bevattend water; het protoplasma verliest daarbij eerder zijn kleurstof dan de kern.

Als *Samenvatting* van dit hoofdstuk kan dus gezegd worden: dat:

1° de nuclealreactie volgens FEULGEN en ROSSENBECK inderdaad als een microchemische reactie opgevat moet worden op nucleïnezuren, die identiek of nauw verwant zijn aan het thymonucleïnezuur.

2° de reactie toe te passen is op weefsels, welke in alle mogelijke fixatieven, uitgezonderd het osmiumzuur en osmiumzuurhoudende mengsels, zijn gefixeerd.

HOOFDSTUK III.

De Bestanddeelen der cellen, welke een positieve nuclealreactie geven.

In dit hoofdstuk zullen achtereenvolgens besproken worden:

A. De resultaten welke door andere onderzoekers met de methode van FEULGEN en ROSSENBECK verkregen zijn.

B. De verschillende meeningen, welke omtrent den bouw der kern bestaan.

C. De uitkomsten, welke mijn eigen proeven met de nuclealreactie hebben opgeleverd.

D. Het onderzoek op den kop van spermatozoën.

E. Het onderzoek op zure en basische kernen.

F. Conclusies, en kritiek op andere in de literatuur voorkomende meeningen.

A. Resultaten door andere onderzoekers verkregen.

Uit de physiologisch-chemische onderzoekingen, welke FEULGEN en ROSSENBECK verricht hebben over de samenstelling der nucleïnezuren, bleek, dat de reactie van SCHIFF slechts bij het uit hexosen gevormde thymonucleïnezuur positief uitvalt, negatief daarentegen bij het pentosen bevattende nucleïnezuur uit gistcellen, het guanylzuur uit het pancreas en het inosinezuur uit spieren. Proeven, waarbij de nuclealreactie verricht werd op gistcellen, leidden dan ook tot een negatieve uitkomst. Ook waren in bacteriën geen uit hexosen opgebouwde nucleïnezuren aanwezig.

Het door OSBORNE geïsoleerde triticonucleïnezuur uit de tarwe bleek uit latere onderzoekingen van LEVENE en LA FORGE identiek

te zijn met het nucleïnezuur uit de gistcellen. Aangezien dit nucleïnezuur nu in twee, ver uit elkaar staande, planten was aangetoond, meende men te mogen aannemen, dat de celkernen van alle planten wel uit dit pentosenhoudende nucleïnezuur zouden zijn samengesteld. Stilzwijgend werd hierbij aangenomen, dat het triticonucleïnezuur uit de celkernen der tarwe afkomstig moest zijn, hoewel goede gronden daarvoor ontbraken. Immers was het niet mogelijk geweest hier geïsoleerde kernen zonder het daarbij behoorende protoplasma chemisch te onderzoeken.

Bij toepassing der nuclealreactie bleek nu aan FEULGEN en ROSSENBECK dat, tot hun verbazing, de kernen in de embryozak der tarwe positief reageerden. Ook kernen van andere plantencellen bleken bij een verder onderzoek deze reactie te geven. Daarmee was dus aangetoond, dat ook in plantenkernen nucleïnezuren voorkomen, die bij hydrolyse nucleal opleveren.

Uit het dierenrijk werden zoowel protozoën als metazoën onderzocht. Terwijl van de onderzochte ééncelligen de ciliaten (o.a. *Nyctotherus* uit de kikvorschdarm) een uit hexosen opgebouwd nucleïnezuur bevatten, bleken de kernen van Trypanosomen geen spoor der kleuring te vertoonen. Van de metazoën gaven de celkernen van alle onderzochte dieren een positieve uitkomst.

Celkernen, waarin geen uit hexosen opgebouwde nucleïnezuren aanwezig zijn, schenen door onderzoekingen van VOSS (1925) in ruimeren kring in het dierenrijk voor te komen. Door hem werd n.l. meegedeeld, dat van menschelijke spermatozoën slechts het achterste gedeelte van den kop een positieve reactie geeft, terwijl het voorste gedeelte òf in het geheel niet reageert òf slechts in zoo geringe mate, dat dit verschil in kleur met het achterstuk niet alleen door de geringere dikte van het voorstuk kan worden verklaard. Ook voor de spermatozoën van den stier kon VOSS („durch besondere Versuchsbedingungen" zooals hij meedeelt; waarin deze echter bestaan wordt voorloopig nog niet medegedeeld) aan den kop een nuclealpositief achterste — van een nuclealnegatief voorste gedeelte onderscheiden. Hij meent, dat op grond van deze uitkomsten vaststaat, dat de spermatozoënkop van mensch en stier uit minstens twee chemisch verschillende substanties is opgebouwd, waarvan de eene uit een nucleïnezuur

van het type van het thymonucleïnezuur bestaat, de andere daarentegen niet.

Ook nog in een ander geval vond Voss morphologische structuren, waarin in het eene orgaan het thymonucleïnezuur aanwezig was, in een ander echter gemist werd. Zoo bleken ook de nucleoli der celkernen op de nuclealreactie positief te reageeren. Voss acht dit daarom van belang, omdat er uit volgt, dat tusschen nucleoli en nucleïnezuur een chemische affiniteit, zoo niet identiteit blijkt te bestaan, terwijl tot nu toe algemeen werd aangenomen, dat de nucleoli uit stoffen waren opgebouwd, die chemisch geheel en al van de nucleïnen zouden verschillen. Het zich kleuren met het fuchsinezwaveligzuur geldt echter alleen voor de nucleoli der somatische cellen. Want de nucleoli der eicellen van de kikker, de negenoog en de kat bleken geen nuclealreactie te vertoonen, dus geen thymonucleïnezuurachtige stoffen te bevatten.

Feulgen en Rossenbeck deelen mede, dat de beelden der kernen, welke zij met hun nuclealreactie verkrijgen, geheel overeenkomen met die, welke na kleuring met kernkleurstoffen ontstaan; dit wil dus zeggen dat het „chromatine" der histologen als nucleïnezuurhoudend moet worden beschouwd. Daarenboven kon Voss ook aan het kernsap soms een duidelijke, zij het ook niet zeer intensieve nuclealkleuring waarnemen.

B. Verschillende meeningen omtrent den bouw der kern.

Tot zoover over de gegevens, die tot nu toe met de reactie van Feulgen en Rossenbeck zijn verkregen. Alvorens nu verslag uit te brengen over mijn eigen waarnemingen, zal eerst moeten worden uiteengezet uit welke bestanddeelen de kern bestaat. De algemeen geldende opvatting over den bouw der kern, welke in de meeste leerboeken der histiologie (de leerboeken van Pekelharing, Stöhr—Schultze—von Möllendorff, Schaffer, Szymonowicz, Petersen, Policard, Schäfer, om slechts de modernere te noemen) wordt vermeld, is de volgende:

1° In de eerste plaats onderscheidt men aan de kern een *kernmembraan,* waardoor zij van het cel-plasma wordt afgegrensd. Deze kernmembraan kan een verschillende dikte be-

zitten; zij kan aan haar oppervlakte voorzien zijn van kleine doornvormige uitsteeksels waaraan protoplasmadraadjes schijnen te kunnen insereeren, of zij kan diepe spleten vertoonen, waardoor de kern het aspect krijgt van in meerdere deelen te zijn verdeeld. Ook kunnen kleine plooien in de kernmembraan voorkomen. De kernmembraan gedraagt zich basophiel tegenover kleurstoffen. Bij de mitotische kerndeeling schijnt zij spoorloos te verdwijnen.

2° De binnen deze membraan zich bevindende inhoud bestaat vooreerst uit een fijndraderig netwerk, het z.g. *lininenetwerk*. Deze lininedraadjes zijn moeilijk te kleuren; ze worden daarom als de achromatische substantie in de kernstructuur beschouwd. Toch is deze achromasie geen absolute, bij sterkere kleuring met basische kleurstoffen nemen zij deze in lichten graad op.

3° Tegen dit netwerk aan liggen korrels van verschillende grootte, *chromiolen*, die door dit netwerk a.h.w. worden gesteund. Deze korrels zijn in sterke mate basophiel; zij vormen het bestanddeel der kern, dat zich met de gewone kernkleurmethoden kleurt, worden daarom ook *chromatine*korrels genoemd. In verschillende celkernen, doch zelfs ook in dezelfde kern, kunnen zij in verschillende gedaanten voorkomen, afhankelijk van de soort celkern en van den physiologischen toestand, waarin ze zich bevindt. Zoo b.v. in den vorm van talrijke fijne korreltjes; of als enkele grootere onregelmatig gevormde korrels, of zelfs als één groote homogene massa.

4° In de mazen van het lininenetwerk bevinden zich ook nog één of meer *nucleoli*, ronde lichaampjes, die in tegenstelling met het chromatine vooral zure kleurstoffen aantrekken.

Terwijl sommige onderzoekers de nucleoli als massieve structuurlooze eiwitophoopingen beschouwen, meenen anderen het voorkomen van verschillende structuren hierin te hebben waargenomen. Zoo vermeldt MONTGOMERY (1899) dat in de grootere nucleoli der gangliecellen, eicellen en bepaalde kliercellen, in tegenstelling met kleine structuurlooze nucleoli, vacuolen zijn aan te toonen. Volgens ROHDE (1903) kan de vacuoliseering der nucleoli in eicellen van *Cobitis* zoo sterk worden, dat de eigenlijke nucleolusmassa als een dundradig netwerk de vacuolen insluit.

Door anderen worden de vacuolen als vaste lichaampjes beschouwd en naar hun ontdekker lichaampjes van SCHRÖN genoemd. ROHDE (1903) meent in de nucleolusvacuolen der *Cobitis*-eicellen kleine vaste lichaampjes te hebben aangetoond. Ook LUBOSCH (1902) had dergelijke lichaampjes gevonden bij de door hem genoemde kapselnucleoli van het tritonei.

Sinds de door FLEMMING (1876) gemaakte onderscheiding in *hoofd-* en *bijnucleoli* in de eicellen van mollusken, werden deze beide soorten, welke zich verschillend ten opzichte van kleurstoffen gedragen, door verschillende onderzoekers in eicellen van vele andere dieren aangetroffen. Volgens onderzoekingen van OBST (1899), verricht aan eicellen van slakken en spinnen, zouden zich, na behandeling met boraxkarmijn en methylgroen, de hoofdnucleoli blauwgroen, bynucleoli rood kleuren. Terwijl volgens HAECKER (1893) de bijnucleolus der eicellen (door MONTGOMERY ook *paranucleolus*, door WILSON (1904) *accessorische nucleolus* genoemd) zou overeenkomen met den nucleolus der somatische cellen, meent MONTGOMERY (1899), dat juist de hoofdnucleolus identisch aan dezen laatsten zou zijn. Deze onderzoeker stelde vast, dat hoofd- en paranucleolus verschillend ten opzichte van elkaar geplaatst kunnen zijn; soms liggen zij vlak tegen elkaar aan, waardoor de indruk gewekt wordt, alsof zij genetisch met elkaar samenhangen. Toch meent hij uit zijn onderzoekingen te mogen opmaken, dat een dergelijk genetisch verband tusschen beide kernbestanddeelen moet worden ontkend.

Door JÖRGENSEN (1913) werden de nucleoli in eicellen van *Patella* bestudeerd; naast het voorkomen van kiemvlekjes bestaande uit één der beide nucleolussubstanties, kwamen andere voor waar beide bestanddeelen vermengd voorkwamen en den z.g. *amphinucleolus* vormden.

5° Al deze bestanddeelen zouden bovendien nog door een eiwithoudende vloeistof, het kernplasma, omspoeld worden. Evenals het linine zou ook deze substantie moeilijk met kleurstoffen zijn aan te toonen.

Men heeft aan deze morphologische begrippen ook chemische willen binden. Zoo zouden de uit chromatine bestaande chromiolen uit nucleoproteïden zijn opgebouwd, dus nucleïnezuur bevatten. Aan de substantie waaruit de nucleoli zouden bestaan

heeft men den naam *pyrenine* gegeven. UNNA (1913) vat de substanties, waaruit de nucleoli zijn opgebouwd, samen onder den verzamelnaam van *nucleoline*. Dit nucleoline zou behalve het globuline, welks aanwezigheid alleen tot de nucleoli beperkt is, nog uit drie andere eiwitten bestaan, die ook nog in andere deelen van de kern voorkomen. En wel uit: *a*. het nucleïne, dat hoofdzakelijk aan de peripherie van den nucleolus is opgehoopt; *b*. een basische, reduceerende, oxyphiele eiwitsubstantie, die zich met de zure beitskleurstof haemateïne plus aluin krachtig kleurt en in 25% zoutzuur gemakkelijk oplosbaar is; *c*. het eiwitskelet van den nucleolus, eveneens een basich eiwit, dat zich echter met haemateïne-aluin niet sterker kleurt dan met eenvoudige zure kleurstoffen en in 25% Cl onoplosbaar is.

Aan de stof, waaruit de kernmembraan opgebouwd is, heeft men den naam van *amphipyrenine* gegeven.

Het linine, waaruit de draadjes van het netwerk bestaan, werd geïdentificeerd met het *plastine*. Als plastine heeft ZACHARIAS die substantie in de celkern aangeduid, die bij de proeven van MIESCHER met kunstmatige vertering door middel van pepsine en zoutzuur en opvolgende extractie met verdunde sodaoplossing als onopgeloste massa achterblijft en door MIESCHER *onoplosbaar nucleïne* genoemd werd. Daarmee kon deze stof geïdentificeerd worden met die, waaraan door SCHWARZ (1887) den naam van linine was gegeven. MIESCHER beschouwde het plastine als een nucleïne; deze meening was in hoofdzaak hierop gebaseerd, dat beide stoffen onoplosbaar zijn in pepsine-zoutzuurmengsels. Door RUZICKA (1908) is echter een verschil in reactie der beide substanties tegenover andere verteringsmiddelen aangetoond en daarmede hun identiteit ontkend. Zoo zijn nucleïnen, en vooral het nucleïnezuur, gemakkelijk oplosbaar in verdunde alkaliën en trypsine, terwijl het plastine door deze stoffen niet opgelost wordt. Uit zijn proeven meent RUZICKA te mogen besluiten, dat het plastine, wat zijn chemische eigenschappen aangaat, veel meer aan den kant der albuminoieden, dan aan dien der nucleïnen staat.

Aan het kernplasma heeft men nog den bijzonderen naam van *enchylema* toegedacht. Volgens M. HEIDENHAIN (1890) zou de kleurstofoplossing van EHRLICH—BIONDI bijzonder geschikt zijn

dit kernplasma aan te toonen. De celkernen uit de bekkenklier van tritonen, volgens deze methode behandeld, vertoonden naast de blauw gekleurde chromatinekorrels en naast de rood gekleurde nucleoli nog een, meestal sterk paarsrood gekleurde, massa, welke niets anders dan het kernplasma zou voorstellen. Dit plasma doet zich in de praeparaten gewoonlijk voor als een fijnkorrelige substantie, echter kunnen de korrels dikwijls tot grootere klompjes zijn samengebald. Een bepaalde structuur is er niet aan te herkennen; het vult de ruimten tusschen de chromatinekorrels volkomen op. Het kernplasma bezit de eigenschap om gedurende de fixatie sterk te schrompelen; daardoor ziet men dikwijls, dat kernen, welke rijk zijn aan dit kernsap, een ruimte vertoonen tusschen kernmembraan en kerninhoud. De hoeveelheid kernplasma is over verschillende celkernen zeer verschillend verdeeld. Zoo bleken bij een onderzoek over de accessorische geslachtsklieren van Tritonen de kernen der secerneerende cellen in de bekkenklier zeer veel van dit plasma te bevatten. Ook veel plasma, alhoewel in mindere mate dan bij de vorige, bezaten de kernen der secerneerende cellen van de buikklier, evenals de slijmcellen in de cloacaklier [1]). Een gemiddelde hoeveelheid was aanwezig in de kernen van het cloacaepitheel, en van ganglicecellen in het ganglion dorsale masculinum; weinig bevatten de kernen van het gladde- en willekeurige spierweefsel; heel weinig zou voorkomen in de kernen van de epidermis en van het fibrillaire bindweefsel, terwijl de kernen der spermatozoën en roode bloedlichaampjes in het geheel geen kernplasma zouden bezitten.

Door UNNA (1913) werd naast een chemische, ook een morphologische indeeling gegeven van de in de celkern aanwezig substanties. Behalve de membraan rondom de geheele kern en die rondom de nucleoli zouden de volgende zes morphologisch aantoonbare substanties te onderscheiden zijn: basophiel chromatine, oxyphiel chromatine, basophiel nucleoline, oxyphiel nucleoline, basophiel linine, oxyphiel linine. Het zou volgens hem tot op heden niet gelukt zijn het enchylema morphologisch aan te toonen.

Tegen de zeer gecompliceerde en over het algemeen slecht gefundeerde opvatting omtrent den bouw der celkern heeft zich

1) Zie voor de terminologie dezer klieren bl. 68.

ROSENSTADT (1918) verzet. Volgens dezen onderzoeker zouden de anilinekleurstoffen, waarmede veelal kernen gekleurd worden, in het geheel geen juist beeld der kernstructuren geven; de beelden, die men te zien krijgt, zooals b.v. de verdeeling tusschen basi- en oxychromatine zijn zeer verschillend al naar gelang van den duur der differentiatie. In zijn groote reeks onderzoekingen kon ROSENSTADT zich bij deze kleuringen van het linineskelet of kernplasma nooit een heldere voorstelling maken. Ook kleuringen met ijzerhaematoxyline volgens HEIDENHAIN geven slechts karikaturen der eigenlijke kernstructuren. Goede constante beelden der kern werden alleen verkregen bij de gewone haematoxyline — (b.v. die van DELAFIELD) of karmijnkleuringen, vooral wanneer niet in canadabalsem, doch in glycerine werd ingesloten. De op deze wijze behandelde praeparaten der epidermis van vogels en zoogdieren toonden duidelijk, dat de kern opgebouwd is uit korrels, welke zich met het haematoxyline of karmijn hebben gekleurd, omgeven door drie andere, ongekleurd gebleven zijnde, korrels. Zoo'n viertal korrels vormt samen een eenheid, een *tetrasoma*. Daarbij is de in het midden gelegen korrel het essentiëele van de kern, de stof, waaruit bij de kerndeelingen de chromosomen ontstaan. Daarom noemt ROSENSTADT ook in dit stadium het centrale granulum reeds chromosoom, terwijl de drie daaromheen liggende korrels karyosomen worden genoemd. De karyosomen zijn homogeen, sterk lichtbrekend, stellen geen afzonderlijke hoeken of mazen van een netwerk voor, doch zijn als contractiele structuren met een vasten aggregaatstoestand op te vatten. In microchemisch opzicht gedragen ze zich als de korrels uit het protoplasma (dat geheel dezelfde uit tetrasomen opgebouwde structuur van de kern bezit), waaraan den naam van plasmosomen werd gegeven. Dat zij met deze laatsten identiek zijn, klinkt zeer aannemelijk, aangezien in de praeparaten (tenminste in het epitheel van jonge embryo's) geen kernmembraan kon worden aangetoond. Ook aan de nucleoli kon ROSENSTADT denzelfden bouw vaststellen. Evenals in het overige gedeelte van de kern, kon in gunstige gevallen worden waargenomen, dat ook de nucleoli bestaan uit een centrale massa, waaromheen drie aan elkaar grenzende deeltjes gelegen zijn, zoodat de geheele nucleolus den bouw van een

tetrasoom vertoont. ROSENSTADT meent dan ook te mogen aannemen, dat de nucleoli als veranderde kerntetrasomen moeten worden opgevat.

Ook door OTO TAMURA (1923) is een minder gecompliceerde bouw der kern verdedigd dan door vroegere onderzoekers werd aangenomen, zij het ook een andere, dan die, welke ROSENSTADT meende te moeten verdedigen. Uitgaande van onderzoekingen, welke de structuur der chromosomen tot doel hadden, kon hij de reeds eerder door CHRISTINE DE BONNEVIE (1908) vermelde opvatting over de dubbele structuur dezer lichaampjes bevestigen. Het bleek haar n.l. dat de chromosomen niet moeten worden beschouwd als massieve chromatinepartikels, doch als chromatinezakjes met een acidophiele, zich met safranine kleurende, inhoud. Deze nieuwe opvatting omtrent de structuur der chromosomen heeft TAMURA kunnen bevestigen; daarbij is hij een stap verder gegaan en heeft haar ook toegepast op de chromatinekorrels der rustende kern. Ook deze zouden een dubbele structuur bevatten en bestaan uit een acidophiel centrum, waaromheen een basophiele massa gelegen is. De conclusies over den bouw der kern, die TAMURA trekt op grond van zijn onderzoekingen aan weefsels van tritonen, van lagere dieren en van planten, zijn de volgende: De kern bestaat slechts uit twee morphologisch aantoonbare substanties, een basophiele, overeenkomend met wat door vroegere onderzoekers als chromatine werd beschouwd, en een acidophiele, overeenkomend met het pyrenine der nucleoli. Beide komen vermengd naast elkaar voor en wel zoodanig, dat de acidophiele massa zich steeds centraal bevindt, terwijl de basophiele er als een mantel over heen ligt. Op grond hiervan wordt het eerste *entocaryoplasma,* het tweede *ectocaryoplasma* genoemd. De reactie tegenover zure en basische kleurstoffen, de z.g. basophilie en acidophilie der kernbestanddeelen, hangt slechts af van de verhouding tusschen basophiele en acidophiele substantie. In de kleinere chromatinekorrels ligt de verhouding ten gunste van de basophiele, waardoor de aanwezigheid van het acidophiele geheel verborgen wordt; in de grootere korrels en in de nucleoli is het omgekeerde het geval, zoodat hier juist de basophiele mantel door de groote hoeveelheid acidophiele massa niet in het oog valt. Dat echter ook de nucleoli uit een acido-

phiele kern en een basophiele schaal zijn opgebouwd was reeds aan vroegere onderzoekers bekend (HEIDENHAIN (1907), TELLYESNICZKY (1905)). Het linine en de kernmembraan bestaan uit basophiele substantie.

MAZIARSKI (1901) is op grond van onderzoekingen betreffende de veranderingen, welke de kern der epitheelcellen in den tractus intestinalis bij de Isopoden *Idothea*, *Sphaeroma* en *Woshea* gedurende de secretie ondergaat, tot de opvatting gekomen, dat zij opgebouwd is uit lininedraden, welke door het structuurlooze chromatine zijn geïmpregneerd. Het linine zou verder identiek zijn aan het celplasma. Zoodat dus de kern slechts te beschouwen is als een deel van het cytoplasma, waarin zich nucleïnezuurhoudende eiwitten hebben opgehoopt. (Voor verdere bijzonderheden zij naar blz. 74 verwezen).

C. Eigen onderzoek.

De in dit hoofdstuk en in volgende te vermelden onderzoekingen zijn verricht op dierlijke weefsels. Meer met het doel om het door FEULGEN en ROSSENBECK meegedeelde na te gaan dan om een bijdrage te leveren van de waarde der nuclealreactie voor de botanie, werden kleuringen verricht op worteltopjes van hyacinthen en uien. Daarbij kon hetgeen door genoemde onderzoekers is vastgesteld bevestigd worden: ook hier was een positieve reactie der celkern vast te stellen.

Het microscopisch onderzoek van een groot aantal dierlijke weefsels, op zeer verschillende wijze gefixeerd, en behandeld volgens FEULGEN en ROSSENBECK (4 minuten hydrolyseeren en een verblijf van 1½ uur in fuchsine zwaveligzuur) gaf de volgende bijzonderheden aan de celkernen te zien:

1° Kernen met gelijkmatig sterk paars gekleurde korrels. Ook de kernmembraan en de nucleoli (die niet veel grooter zijn dan de vorige korrels) hebben zich gelijkmatig violet gekleurd. Tusschen de korrels zijn eveneens paars gekleurde draadjes waar te nemen; het karyoplasma is ongekleurd gebleven. In fig. 1, waar kernen der gladde spiercellen uit de kikvorschdarm zijn afgebeeld, ziet men behalve de kernmembraan de sterk gekleurde korrels en nucleoli, waartusschen fijne draadjes zijn uitgespannen, terwijl zich het kernplasma niet gekleurd heeft.

2° Kernen, die hetzelfde beeld als onder 1 genoemd vertoonen, doch waarbij tevens een licht diffuse kleuring van de geheele kern valt op te merken. Klaarblijkelijk heeft in dit geval het karyoplasma ook op de nuclealkleuring gereageerd. Dergelijke kernen worden in verschillende weefsels waargenomen; in fig. 14 en 15 is dit type in de bekkenklier van den salamander weergegeven.

3° Kernen met grootere nucleoli (waarbij de nucleoli ongeveer tweemaal zoo groot zijn als de andere korrels) vertoonen een niet gelijkmatige kleuring dezer lichaampjes; terwijl de peripherie der nucleoli zich n.l. sterk violet gekleurd heeft, vertoont het centrum een minder sterke paarse kleur.

4° Kernen met groote nucleoli; de grootte dezer lichaampjes overtreft het dubbele van dat der overige korrels. Men vindt dergelijke kernen b.v. in ganglicellen, in ovogoniën enz. Hier is nog duidelijker het verschil te zien tusschen den zich sterk kleurenden rand en het lichter gekleurde centrum in den nucleolus. In fig. 2 ziet men dergelijke nucleoli in de ovogoniën van een kikvorschovarium.

5° Nemen de nucleoli sterk in grootte toe (in eicellen, in spiercellen van *Helobdella Stagnalis*) dan worden allerlei overgangen waargenomen tusschen nucleoli als sub. 4 genoemd, nucleoli met een licht violetten rand en een ongekleurd centrum, en geheel ongekleurde nucleoli. Zoo is in fig. 3 de kern eener spiercel van den zuigworm *Helobdella Stagnalis* afgebeeld, waarin de nucleolus zich als een ongekleurd vlekje temidden der violette korrels bevindt.

6° Nucleoli, welke wat grooter zijn dan de overige korrels (het is uiterst moeilijk, zoo niet ondoenlijk, in deze gevallen aan te geven, wat nucleoli en wat de overige korrels zijn; kleuringen met haematoxyline en eosine, en volgens BIONDI, geven naast sterk wisselende beelden, welke, van den graad van differentiëering afhangen, dikwijls korrels te zien die een tusschenkleur tusschen die van de basische en zure kleurstof hebben aangenomen), zich na 4 minuten hydrolyseeren echter gelijkmatig kleuren, vertoonen dikwijls in geringe mate het beeld van donkerder peripherie en lichter centrum na langduriger hydrolyse (10 à 15 minuten). De contrasten tusschen peripherie en centrum

worden bij het kleiner worden der nucleoli(?) hoe langer hoe geringer. De mogelijkheid zou kunnen bestaan, dat de donkerder rand rondom de nucleoli veroorzaakt wordt door een bepaalde breking der lichtstralen en dus berust op een brekingsverschijnsel en niet op een aanwezige structuur. Hiertegen pleiten echter proeven, waarbij gekleurde praeparaten in plaats van in canadabalsem in water en in glycerine werden onderzocht en precies dezelfde beelden vertoonden.

7° Groote nucleoli, welke na 4 minuten hydrolyse geen kleuring meer geven, reageeren nog zwak bij korter durende hydrolyse of hydrolyse bij lagere temperatuur. Zoo toont fig. 4 een kern der spiercel van *Helobdella Stagnalis*, waarbij de dubbele structuur van den nucleolus na 2 minuten hydrolyse bij 55° C. nog duidelijk is waar te nemen. Na een hydrolysetijd van 4 minuten bij 60° zou de nucleolus niet meer reageeren (men vergelijke fig. 3).

Het verschil in kleurintensiteit tusschen het periphere en centrale gedeelte van den nucleolus wordt bij het grooter worden der nucleoli hoe langer hoe geringer.

8° Aan de chromatinekorrels is het niet gelukt dubbele structuren, bestaande uit sterk gekleurde peripherie en minder sterk gekleurd centrum waar te nemen, ondanks verschillende combinatie van hydrolysetemperatuur en hydrolyseduur en ondanks de gunstigste omstandigheden van microscopische waarneming (gebruik van apochromaatimmersie 1,5 m.M., apert. 1,3 van Zeiss en compensatieoculairen).

9° Chromosomen kleuren zich sterk met het zwaveligzure-fuchsine (onderzoek op kerndeelingen, voorkomend in weefsels van embryo's van zoogdieren en kippen). Van een dubbele structuur der chromosomen was niets te bespeuren.

10° Kernen, waarvan het karyoplasma zich na 4 minuten hydrolyse zwak gekleurd heeft, vertoonen een ontkleuring hiervan bij langer voortgezette hydrolyse (10 à 15 minuten).

11° Kernen met een negatief reageerend karyoplasma na een hydrolysetijd van 4 minuten vertoonen bij korter durende zoutzuurinwerking soms een zwak violette kleur er van.

12° In sommige kernen gelukt het niet, ondanks verschillende

combinaties van hydrolysetijd en hydrolysetemperatuur, een kleuring van het karyoplasma te verkrijgen.

Alvorens nu de gevolgtrekkingen, welke uit deze uitkomsten gemaakt kunnen worden, te bespreken, zullen eerst onderzoekingen over den bouw van den kop van spermatozoën en over zure en basische kernen worden meegedeeld.

D. **Het onderzoek op den kop van spermatozoën.**

Door Voss (1925) wordt meegedeeld, dat hij, met de nuclealreactie, verschil in kleurbaarheid tusschen bepaalde deelen van den kop van spermatozoën heeft aangetroffen. Deze mededeeling behoeft geen verwondering te wekken. Het is immers bekend, dat men bij spermatozoën aan dat gedeelte, dat voor den hals ligt, een onderscheid maakt tusschen den eigenlijken kop (caput) en het daarvóór gelegen perforatorium. Deze deelen laten zich niet alleen van elkaar onderscheiden door hun verschillend gedrag ten opzichte van kleurstoffen, histogenetisch hebben beide een verschillenden oorsprong. Terwijl het caput moet worden beschouwd als de van vorm veranderde kern van de spermatide, hebben onderzoekingen van Meves (1897) geleerd, dat het perforatorium ontstaan zou zijn uit het idiosoma. Bij de verdere ontwikkeling van de spermatide treden de centraallichaampjes uit het idiosoma, dit laatste beweegt zich in een boog naar het voorste gedeelte van de celkern om daar dan tot perforatorium te worden. Uit de mededeeling van Voss is niet uit te maken, of met het verschil in gedrag tusschen bepaalde deelen van den spermatozoënkop bedoeld wordt het verschil tusschen perforatorium en caput, of dat aan deze laatste nog verschil in structuur is waar te nemen. Ook aan het caput worden n.l. meestal nog twee gedeelten onderscheiden, een pars anterior en een pars posterior. Het is mogelijk, dat Voss dank zij zijn „besondere Versuchsbedingungen" met behulp der nuclealreactie een verschil in deze twee deelen heeft kunnen aantoonen. In mijn eigen praeparaten is mij dit niet mogen gelukken. Het caput van spermatozoën van hond, kat, konijn, rat, muis, kikvorsch, Patella coerulea vertoont met het fuchsinezwaveligzuur een gelijkmatige kleuring. Bij langduriger hydrolyse (20 en 30 minuten) was aan

den kop van muizenspermatozoën wel een minder sterke kleuring van het voorste deel, vergeleken met het pars posterior te herkennen; dit verschil moet echter op een verschil in dikte tusschen beide deelen worden teruggebracht.

E. Zure en basische kernen.

Met behulp van zijn kaliumpermanganaat- en rongalietwitmethode meende UNNA (1914) in de weefsels gedeelten te kunnen onderscheiden, waarin reducties optreden, veroorzaakt door het daar aanwezige katalase, terwijl andere een oxydeerende werking uitoefenen, dank zij hun gehalte aan oxydase. De eersten reduceeren het kaliumpermanganaat tot het bruine mangaanoxyde; in de laatste wordt het rongalietwit tot een blauwe kleurstof geoxydeerd. Het bleek, dat de plaatsen, waar een oxydeerende werking werd uitgeoefend, in de celkernen gelegen waren, terwijl het celplasma reduceerend werkte. En wel moet deze oxydeerende werking aan de nucleoli toegekend worden, die dank zij hun gehalte aan globuline in staat zijn de in het protoplasma aanwezige zuurstof *los* te binden en daardoor voor de kern te behouden, terwijl de overige basische bestanddeelen van de kern en het protoplasma slechts tot reduceeren in staat zijn, doordat zij alle vrije zuurstof verbruiken en er een *vaste* binding mee aangaan.

Reeds is meegedeeld, dat de nucleoli behalve uit globuline nog uit drie andere eiwitten bestaan. Deze vier eiwitten, waarvan er twee zuur en de beide anderen basisch reageeren, komen in normale, tot deeling in staat zijnde kernen, alleen in de nucleoli voor, terwijl de overige kernbestanddeelen door de drie laatste eiwitten (zonder het globuline dus) worden samengesteld. Het bleek nu echter, dat er ook kernen waren, waarin het globuline zich over het geheele lichaam had verspreid; tot deze tweede groep behooren die kernen, welke zich niet meer kunnen deelen, wier taak het slechts is een rol bij de stofwisseling te spelen. Deze kernen hebben dus in haar geheel de samenstelling van de nucleoli, en kunnen, zoowel in chemischen als biologischen zin, als één grooten nucleolus worden opgevat. De tweede groep van kernen noemt UNNA de *zure kernen*, dank zij het rijkelijk voorkomen van het zure globuline. Hoe meer zure kernen zich in een weefsel bevinden, hoe meer behoefte dat weefsel heeft aan

zuurstof, welke in los gebonden toestand is opgehoopt, en hoe meer in dat weefsel de aanmaak van nieuwe cellen op den achtergrond is geschoven.

Eigen onderzoek.

Als materiaal van onderzoek dienden de kernen van het samengesteld plaveiselepitheel, voorkomend op de huid en op de muizentong, en de kernen van een vogelsarcoom. De stukjes weefsel waren in absoluten alcohol gefixeerd en ingebed in paraffine. Met de methode van UNNA, verricht op paraffinecoupes, waren duidelijk de verschillen in kleur te zien tusschen de zich met haematoxyline kleurende blauwe kernen en de safraninophiele zure kernen. Bij de kleuring volgens UNNA werden de coupes na behandeling met haematoxyline in een 1% oplossing van safranine gedurende 20 minuten gekleurd en daarna gedifferentiëerd in een tanninebeits, bestaande uit 2,5 gr. tannine en 10 mgr. pikrinezuur, opgelost in 10 cc. water. Coupes van hetzelfde object, na hydrolyse blootgesteld aan de inwerking van het zwaveligzure-fuchsine, vertoonden lichter en donkerder gekleurde kernen naast elkaar, waarbij de licht gekleurde kernen overeenkomen met de zure in de volgens UNNA behandelde praeparaten.

De nuclealreactie toont dus aan, dat de z.g. zure kernen zich door een lager gehalte aan thymonucleïnezuur van andere, nog tot deeling in staat zijnde, kernen onderscheiden. In plaats van een duidelijk violet gekleurd netwerk, waarin sterk-paars gekleurde korrels voorkomen, bezitten deze kernen slechts een flauw gekleurd netwerk zonder duidelijk waarneembare korrels. In enkele gevallen, waar een zwakke hydrolyse werd toegepast, trad een lichte diffuse kleuring van de geheele kern op. Een violette kleur buiten de kern wordt nooit waargenomen. Wat onder deze omstandigheden met het nucleïnezuur is gebeurd, of het langzaam uit de kern is gediffundeerd, of in de kern tot nucleolussubstantie (eventuëel globuline) is geworden, kon niet worden uitgemaakt.

F. Conclusies en kritiek op andere in de literatuur voorkomende meeningen.

Overziet men de resultaten, welke de proeven met de nucleal-

reactie hebben opgeleverd, dan valt het op, dat er een vloeiende overgang tusschen chromatinekorrels en nucleoli schijnt te bestaan. Niet alleen in grootte, ook in gedrag tegenover kleurstoffen, is in vele gevallen geen verschil tusschen groote chromatinekorrels en kleine nucleoli waar te nemen. De duidelijk te herkennen nucleoli bezitten aan hun oppervlakte een grooter gehalte aan thymonucleïnezuur dan in het centrum. Echter moet op grond van de positieve reactie ook in dit laatste het voorkomen van thymonucleïnezuur worden aangenomen. Bij kleinere nucleoli wordt het verschil in nucleïnezuurgehalte tusschen peripherie en centrum hoe langer hoe moeilijker aan te toonen; in de chromatinekorrels is dit verschil niet meer te herkennen. Groote nucleoli bevatten relatief weinig met zwaveligzure fuchsine kleurbare substanties.

Men kan tegen het voorkomen van den peripheren, zich sterker kleurenden, rand der grootere nucleoli aanvoeren, dat dit gedeelte niet meer tot de nucleoli moet worden gerekend, doch behoort tot het nucleïnezuurhoudend netwerk van draadjes en korreltjes, dat in de rest van de kern is uitgespannen. De nucleoli zouden dan ingebed zijn in de groote mazen van het netwerk en onmiddellijk tegen de draadjes er van aansluiten. Men ziet n.l. meermalen, hoe onmiddellijk aan dezen violetten rand de draadjes en korrels van het kernnetwerk bevestigd zijn. In fig. 2 wordt dit beeld bij *a*. eenigszins verduidelijkt. Ofschoon men hiertegen zou kunnen inbrengen, dat in sommige cellen (vooral in de degenereerende cellen, welke de lichaampjes van HASSALL in de thymus vormen) kernen worden aangetroffen, waarin slechts zeer weinig chromatine aanwezig is, en waarin de daardoor in een bijna chromatinelooze kern geïsoleerd liggende nucleoli eveneens een donkerder gekleurden rand bezitten, behoeft dit laatste nog niet tegen genoemd bezwaar te pleiten. Immers het nucleïnezuurhoudende netwerk kan gereduceerd zijn tot een mantel om den nucleolus gelegen; of enkele nucleïnezuurhoudende draadjes kunnen den mantel nog met de kernmembraan verbinden, doch wegens hun gering aantal en de betrekkelijke grootte van de nucleoli niet in de coupe getroffen zijn. De vraag is alleen deze of men den sterker gekleurden rand met het minder sterk gekleurde centrum als één geheel wil beschouwen en daaraan den naam

nucleolus wil geven, of dat men het centrale gedeelte afzonderlijk als één geheel opvat en hieraan den naam nucleolus toekent. Voor dit laatste pleiten waarnemingen aan bij het snijden der praeparaten buiten de kern geraakte nucleoli in coupes van worteltoppen van hyacinthen, waar de sterker gekleurde rand gemist wordt.

Uit de resultaten, welke de proefnemingen met de nuclealreactie hebben opgeleverd, zou men zich dan moeten voorstellen, dat zich overal in de kern korreltjes nucleolussubstantie van verschillende grootte, meer of minder doordrenkt met nucleïnezuur bevinden (entocaryoplasma van TAMURA), waaromheen substanties met grooter nucleïnezuurgehalte zijn neergeslagen (ectocaryoplasma van TAMURA).

Aan grootere nucleoli ziet men, dat het centrale gedeelte zeer arm aan nucleïnezuur is. Het zou mogelijk kunnen zijn, dat de licht-violette kleur, welke men hier waarneemt, in werkelijkheid niet bestaat, doch veroorzaakt wordt, doordat de nucleolus als bolle lens werkt voor het daaronder gelegen paars gekleurde gedeelte der kern. In dit geval zou dus het centrum der nucleoli geen nucleïnezuur bevatten. Ik meen hiertegen te moeten inbrengen, dat in de genoemde gedegenereerde kernen der lichaampjes van HASSALL, waar de kern bijna geheel ongekleurd is, het nucleoluscentrum eveneens een duidelijk waarneembare violette kleur bezit. In dit geval is dus een werking als bolle lens voor de daaronder gelegen violette lichtstralen uitgesloten.

Op grond van de beelden, welke aan de kernbestanddeelen verkregen zijn, ligt het vermoeden voor de hand, dat elke korrel, hetzij een z.g. „chromatine"-korrel, hetzij nucleolus, ongeveer dezelfde bepaalde hoeveelheid nucleïnezuur heeft, hetwelk zich aan de oppervlakte meer ophoopt als in het centrum. Bij de kleinere korrels is deze hoeveelheid in één kleine ruimte gecondenseerd, zoodat een duidelijke nuclealreactie verkregen wordt; bovendien grenzen centrum en peripherie zoo dicht aan elkaar, dat een verschil in zuurgehalte tusschen beide deelen niet wordt waargenomen. Bij de groote nucleoli is het nucleïnezuur over zoo'n groote ruimte uitgespreid, waardoor bij hydrolyse het zoutzuur van alle kanten er mee in contact kan komen, dat een betrekkelijk geringe hydrolyse reeds in staat is een zoodanige

afbraak teweeg te brengen, dat het zwaveligzure fuchsine geen nucleal meer aantreft. Bij juist gekozen hydrolyse wordt door de verdeeling over een groote ruimte, slechts een zwakke kleur waargenomen. De hoeveelheid nucleïnezuur, welke in één kernkorrel aanwezig is, is niet voor alle kernen dezelfde. Vergelijkt men van verschillende cellen de grootte der nucleoli onderling met de violette kleur, welke zij na eenzelfde behandeling hebben aangenomen, dan blijkt, dat sommige nucleoli veel zwakker gekleurd zijn dan andere. Vergelijkt men b.v. de nucleoli van eenzelfde grootte in de eicellen van een kikvorsch (afgebeeld in fig. 2) met die in een spiercel van *Helobdella Stagnalis* (afgebeeld in fig. 3), dan blijkt, dat na vier minuten hydrolyse bij 60° C. de laatste geen kleur meer vertoonen, terwijl de eerste nog duidelijk violet getint zijn. De z.g. lininedraadjes geven eveneens de reactie, bevatten dus waarschijnlijk dezelfde met fuchsinezwaveligzuur reageerende stof als de z.g. chromatinekorrels.

Bovendien komen ook in het karyoplasma geringe hoeveelheden van deze stof voor. Aan een kunstproduct, veroorzaakt door het uittreden van nucleïnezuur uit de korrels gedurende de hydrolyse behoeft niet gedacht te worden, aangezien in dit geval alle kernen een diffuse kleuring zouden vertoonen, terwijl in één en hetzelfde praeparaat kernen met en kernen zonder gekleurd karyoplasma aan te treffen zijn. Het is zeer waarschijnlijk (onderzoekingen over kliercellen zullen dit nog nader bevestigen), dat men hierin een uitdrukking van de stofwisselingsfunctie der cel heeft te zien, in dien zin, dat het thymonucleïnezuur via het karyoplasma naar het cytoplasma wordt gevoerd, of dat uit het celplasma stoffen worden opgenomen, die in het kernplasma tot nucleïnezuren worden gevormd.

De kernbouw, zooals zij door Rosenstadt is verdedigd, kon ik aan mijn praeparaten niet bevestigen. Noch fixaties met verschillende vloeistoffen, noch het gebruik van haematoxyline als kernkleurstof, noch insluiting in glycerine in plaats van canadabalsem gaven in weefsels van embryo's, jonge of volwassen dieren een duidelijk beeld van het tetrasoom.

Evenmin kon de opvatting van Maziarski bevestigd worden. Wel kan onder bepaalde omstandigheden de kernmembraan verdwijnen, (zoo bij de secretie der epitheelcellen van den tractus

digestivus der door MAZIARSKI onderzochte Isopoden; men zie hiervoor blz. 74) doch hier staat tegenover, dat in bijna alle andere kernen een kernmembraan duidelijk kan worden aangetoond. Ook bewijzen de lininedraadjes door hun positieve nuclealreactie niet-identiek te zijn met het celplasma, zooals volgens MAZIARSKI moet worden aangenomen.

Het gedrag der groote nucleoli tegenover de nuclealreactie geeft nu ook een verklaring van de uitkomst, welke Voss (1925) bij eicellen verkreeg. Deze onderzoeker vond immers, dat de nucleoli van de door hem onderzochte eicellen (van de negenoog, de kikker en de kat) geen nuclealreactie vertoonen, in tegenstelling met die van somatische cellen. Hieruit trok Voss de conclusie, dat de eersten geen thymonucleïnezuur bevatten en dus anders opgebouwd zijn dan de laatsten. Indien Voss korter dan vier minuten, of bij lagere temperatuur gehydrolyseerd had, zou wellicht ook hij hebben waargenomen, dat in de groote nucleoli eveneens een thymonucleïnezuurachtige stof aanwezig is, doch slechts in zeer geringe hoeveelheid.

De resultaten, welke de proeven met de nuclealreactie hebben opgeleverd, pleiten sterk voor een bouw van de kern, zooals die door OTO TAMURA wordt verdedigd. Immers het ligt zeer voor de hand om aan te nemen, dat de positieve nuclealreactie, die de verschillende kernstructuren geven, veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van één bepaalde stof, het thymonucleïnezuur. In dat geval zouden dan, zooals TAMURA op grond van andere proeven reeds heeft uiteengezet, alle kernstructuren (chromatinekorrels, nucleoli, lininedraden) opgebouwd zijn uit een zekere stof waaraan hij den naam van ectocaryoplasma gegeven heeft (en welke dus op grond van de positieve nuclealreactie nucleïnezuurhoudende eiwitten bevat), benevens een andere stof, het entocaryoplasma, overeenkomend met het pyrenine der vroegere onderzoekers, dat de nuclealreactie niet geeft en waarvan de nadere chemische samenstelling tot nu toe nog onbekend is.

Doordat de bovenvermelde uitkomsten sterk pleiten voor een structuur der kern, zooals die door TAMURA is verdedigd, moeten de bezwaren, welke door VON MÖLLENDORFF (1923) tegen deze

opvatting zijn aangevoerd, nader onder de oogen worden gezien. Zooals reeds op blz. 7 is meegedeeld, onderscheidt deze onderzoeker twee soorten van kleuringen: *doordrenkingskleuringen*, ontstaan doordat de celbestanddeelen zich met de kleurstof doordrenkt hebben, en *neerslagskleuringen*, ontstaan doordat de kleurstof aan de oppervlakte der celstructuren is neergeslagen. Alle basische kleurstoffen zijn in zekeren zin neerslagkleurstoffen; sommige in sterke mate (en deze worden gewoonlijk als de beste kernkleurstoffen beschouwd, zooals thionine, toluidineblauw, safranine, e.a.), andere in geringe (victoriablauw, nijlblauwsulfaat, rhodamine), terwijl de meeste zure kleurstoffen als doordrenkingskleurstoffen moeten worden beschouwd. Over het algemeen zullen dus de basische kleurstoffen veel sterker kleuren als de zure. De verschillen in acidophilie zijn terug te voeren op meerdere of mindere dichtheid van de structuur, zoo zijn de nucleoli gekenmerkt door hun grootere dichtheid, vergeleken bij de andere kernbestanddeelen, hetgeen reeds door Pappenheim (1909) was opgemerkt. Van een uitsluitende oxyphilie van bepaalde kernbestanddeelen zou volgens Von Möllendorff geen sprake zijn; alle deelen, welke zure kleurstoffen aantrekken, worden ook door basische gekleurd. Het begrip „basichromatine" is geheel te verwerpen; basichromatine als bestanddeel der kern bestaat niet, aangezien het als een kunstproduct moet worden opgevat. Terwijl dus de waarnemingen van Tamura ook door Von Möllendorff als juist worden beschouwd, meent de laatste ze anders te moeten interprêteeren. Het roode centrum der met haematoxyline en eosine gekleurde chromatinekorrels, chromosomen of nucleoli zouden de morphologisch aantoonbare bouwsteenen zijn waaruit de kern is opgebouwd; de daaromheen liggende basophiele kapsels van ectokaryoplasma kunstmatige neerslagen van basische kleurstoffen om de eigenlijke kernkorrels en -staafjes.

Deze argumenten van Von Möllendorff, welke voor de histologische kleurmethoden gelden, kunnen niet van toepassing zijn op de microchemische reactie volgens Feulgen en Rossenbeck. Op blz. 27 e.v. is uiteengezet, hoe deze methode in wezen totaal verschillend is aan een histologische kleuring. Dat dus langs zuiver microchemischen weg eveneens een dubbele struc-

tuur in de verschillende kernbestanddeelen is waar te nemen, pleit sterk voor de opvatting van TAMURA. Volgens VON MÖLLENDORFF zouden zich de neerslagen der neerslagkleurstoffen vooral om de grovere structuren der kern vormen, zooals om nucleoli, chromosomen, grovere chromatinekorrels, terwijl de andere kernbestanddeelen alleen bij langer durende kleuring zichtbaar worden. De nuclealreactie heeft als uitkomst gegeven, dat juist de kleinere kernkorrels zich sterk met het zwaveligzure fuchsine kleuren, terwijl de grootere, en vooral de groote nucleoli zoowel in het centrum als in het periphere gedeelte (waar de neergeslagen kleurstof juist het sterkst opgehoopt zou moeten zijn) een veel zwakkere kleur hebben. Deze resultaten vormen dus een nieuwen steun voor de opvatting, dat de uitkomsten verkregen na behandeling met neerslag- of doordrenkingskleurstoffen niet vergelijkbaar zijn met die, verkregen na behandeling volgens FEULGEN en ROSSENBECK. Op grond hiervan meen ik, dat de door VON MÖLLENDORFF uitgeoefende kritiek op de gevolgtrekkingen van TAMURA niet van toepassing is op de nuclealreactie en dat de uitkomsten der laatste een steun geven aan de opvatting van TAMURA.

Ten slotte dient de vraag besproken te worden in hoeverre de fixatie, die aan het onderzoek der kernen voorafgaat, aansprakelijk is voor de structuren, die men ziet.

Of deze structuren, aan gefixeerde kernen bestudeerd, ook in de levende celkernen zouden voorkomen, moet in het midden worden gelaten. KITE (1913) kwam door proefnemingen op levende cellen tot de conclusie, dat de kern hierin een gel was, waarin minder-disperse gedeelten in den vorm van een netwerk en granula zouden voorkomen. De kern uit de eicellen van de zeester daarentegen zou bestaan uit een vloeibare massa, begrensd door een kernmembraan. CHAMBERS (1923—'24) echter is tot andere uitkomsten gekomen. Deze onderzoeker meent, op grond van micro-chirurgische proeven aan de celkernen zoowel van geslachts- als somatische cellen, te moeten besluiten, dat de binnen de kernmembraan liggende inhoud een vloeistof is, waaraan geen verdere structuren, uitgezonderd het voorkomen van één of meer nucleoli, te herkennen zijn. De vloeibare kerninhoud kon zelfs door middel van een micropipet

worden weggezogen. Bij beschadiging der kern verandert haar inhoud veelal in een compacte gel, waarin een netwerk te onderscheiden is, overeenkomend met het chromatinenetwerk in gefixeerde kernen. In de kernen van somatische cellen treedt dit netwerk gemakkelijker op als in die van geslachtscellen. Reagentia, welke een coagulatie veroorzaken, roepen dat netwerk onmiddellijk te voorschijn.

In dit verband moge herinnerd worden aan de proeven over reversibele gelvorming van Mej. Dr. VAN HERWERDEN (1926), welke eveneens na toevoeging van bepaalde reagentia in microscopisch homogeen uitziende cellen en celkernen, structuren zag ontstaan. Al naar gelang van de concentratie dezer reagentia waren de structuren reversibel, d.w.z. de cellen verkregen na spoeling met de vloeistof van RINGER weer haar vorig homogeen uiterlijk, of het celplasmasol coaguleerde tot een irreversibele gel. Ook CHAMBERS (1923—'24) had een dergelijk verschijnsel van reversibele gelvorming reeds waargenomen. Indien kernen, welke op het punt staan zich mitotisch te gaan deelen, aangeraakt worden, ontstaan hierin minder-disperse structuren, welke overeenkomen met het spireem van zich reeds deelende kernen, om na ophouding der aanraking tot de oorspronkelijke homogeniteit terug te keeren. Indien zich deelende kernen worden aangeraakt, wordt plotseling een verder stadium der deeling tevoorschijn geroepen, en na ophoud dat der aanraking tot het vorig stadium terugkeert.

Het is zeer aannemelijk, dat latere onderzoekingen de uitkomsten van CHAMBERS zullen bevestigen, en dat de kerninhoud als een structuurlooze vloeistof moet worden beschouwd. Ook in dit geval zou een verklaring zeer goed mogelijk zijn voor de structuren, welke in de gefixeerde kern worden waargenomen. Immers CHAMBERS zelf vermeldt, hoe beschadiging der kern gepaard kan gaan met een verdwijnen der nucleoli door oplossing. Het is nu mogelijk, dat fixatie eerst een oplossing van de nucleoli, geheel of gedeeltelijk, ten gevolge heeft en daarna pas een coagulatie van het met de nucleolussubstantie partiëel gemengde nucleïnezuur tot stand komt, in dien zin, dat om de deelen met grooter gehalte aan nucleolussubtantie deelen met grooter nucleïnezuurgehalte worden neergeslagen.

Indien men de structuren, zooals die in de gefixeerde kern te zien zijn, als gepraeformeerd in de levende kern wil voorstellen, moet men aannemen, dat zich hier korrels van verschillende grootte bevinden, bestaande uit nucleolussubstantie, waarin nucleïnezuur opgelost is zoodanig, dat de laatste aan de peripherie in grootere concentratie voorkomt als in het centrum. Bovendien zou elke korrel, onverschillig of zij groot of klein is, ongeveer eenzelfde hoeveelheid nucleïnezuur bevatten.

Indien men echter de kerninhoud als een eiwithoudende vloeistof wil beschouwen (en de proeven van CHAMBERS vormen een goeden grond voor deze opvatting) dan klinkt het zeer aannemelijk om deze vloeistof op te vatten als een mengsel van eiwitten, waarin o.a. nucleolussubstantie plus nucleïnezuur aanwezig zijn. Daarbij kunnen meer visceuse ophoopingen van in hoofdzaak (of uitsluitend?) nucleolussubstantie in den vorm van nucleoli voorkomen. Bij de fixatie wordt het mengsel zoodanig neergeslagen, dat rondom een centrum van lager nucleïnezuurgehalte een peripherie van hooger nucleïnezuurgehalte wordt afgezet.

HOOFDSTUK IV.

De nuclealreactie toegepast op degenereerende celkernen.

Behalve aan de normale celkern zou het van belang zijn de nuclealreactie ook toe te passen op degenereerende kernen, omdat hier de mogelijkheid zou zijn gegeven na te gaan in hoeverre het chromatine bij kernafbraak nog positief reageert. Verschillende weefsels komen als materiaal voor dit onderzoek in aanmerking:

1° Weefsels, waarbij als pathologisch verschijnsel kerndegeneratie optreedt.

2° Weefsels, waarbij deze degeneratie een meer physiologisch karakter heeft, zooals dit met de kernen der holokrine klieren het geval is. Ook die klieren, waarbij de kern niet geheel te gronde gaat, doch actief deelneemt aan de vorming van het sekreet door afgifte van kernbestanddeelen, vormen interessante objecten van onderzoek.

Achtereenvolgens zullen verschillende weefsels onderzocht worden, welke kernen bevatten, waaraan de genoemde veranderingen zijn waar te nemen.

A. Kerndegeneraties optredend in een nier met onderbonden circulatie.

Een geschikt voorwerp om verschillende vormen van kerndegeneratie te bestudeeren vormt, sinds de onderzoekingen van Schmaus en Albrecht (1894), de nier van een proefdier, waarin de circulatie door onderbinding een bepaalden tijd heeft stilgestaan. Deze onderzoekers vonden, dat reeds na een onderbindingstijd van 24 uur verschillende vormen van degeneratie aan het nierepitheel zijn waar te nemen. Sommige cellen vertoonen duidelijk den *karyorhectischen vorm;* het begin dezer ontaarding

uit zich in een verlies der netvormige structuur van het chromatine en een ophooping van dit laatste tegen de kernmembraan, waarop dan afsnoering van chromatinedeeltjes en een uiteenvallen der kern in afzonderlijk liggende deeltjes volgt. Met de verplaatsing van het chromatine en het uiteenvallen in stukken gaat een verlies der kleurbaarheid gepaard, hetwelk volgens de onderzoekers waarschijnlijk zou berusten op uitlooging der kleurbare massa door de omgevende weefselvochten. (*Karyolysis*). Wordt een afstervende kern aan een sterke omspoeling van de weefselvochten blootgesteld, dan wordt de karyorhexis vroegtijdig door het verlies in kleurbaarheid onderbroken of het chromatine wordt reeds uitgeloogd, vóórdat een verplaatsing tot kernwandhyperchromatose heeft geleid (*chromatolysis*). Aan de karyorhexis kan ook nog voorafgaan een schrompeling en verdichting van het chromatinenetwerk en daarmee een sterkere kleurbaarheid van de kern (*pyknose*).

Eigen onderzoek.

Bij een volwassen rat werd onder aethernarcose laparatomie verricht en de linker a. renalis onderbonden; de wond werd vervolgens weer gesloten. Vijf dagen na de operatie werd het dier gedood, beide nieren in sublimaat gefixeerd (de rechter nier diende als contrôle) en tot paraffinecoupes verwerkt.

Het microscopisch onderzoek aan praeparaten, welke met haematoxyline en eosine gekleurd waren, leerde, dat de degeneratie zoo ver was voortgeschreden, dat van de kernen der niertubuli nog maar weinig meer te zien was. Op sommige plaatsen was de kern in haar geheel als een zwak gekleurd lichaam te herkennen, op andere was van de aanwezigheid van een kern niet het minste te bespeuren. De cellen der glomeruli en van het nierstroma vertoonden op fraaie wijze alle stadia van kerndegeneratie. Verschillende overgangen kunnen worden waargenomen tusschen sterk gekleurde, pyknotische kernen en karyorhectische kernen, waarvan nog slechts enkele chromatinedeeltjes zijn overgebleven.

Volkomen dezelfde beelden als de haematoxyline-eosine-praeparaten vertoonen de volgens Feulgen en Rossenbeck behandelde coupes. Naast duidelijk gekleurde chromatinebrokken

der karyorhectische kernen, vertoonen de uitgeloogde kernschimmen der niertubuli een zwakke violette kleur. Zoo ziet men in fig. 5 de reeds gedeeltelijk uitgeloogde deelen van een in twee stukken uiteengevallen bindweefselkern. In fig. 6 ziet men bij b. een gedegenereerde kern met een sterk gekleurd gedeelte grenzend aan een uitgeloogd deel, terwijl in a. de chromatineresten van een uiteengevallen kern duidelijk zijn waar te nemen. Fig. 7 vertoont eveneens kleine chromatinekorrels van gedegenereerde kernen. Terwijl bij a. de kernvorm niet meer te herkennen is, ziet men, dat deze bij c. nog behouden is gebleven; in b. en d. is de kern grootendeels uitgeloogd, op een enkele chromatinekorrel en op de nog duidelijk positief reageerende kernmembraan na. Ook fig. 8 vertoont een gedegenereerde kern, waar, dank zij de nog aanwezige kernmembraan, de oorspronkelijke vorm der kern behouden is gebleven, terwijl zich binnen de kernmembraan een aantal kleine, doch duidelijk gekleurde, chromatinekorrels bevinden. In fig. 9 vindt men een wijze van degeneratie, zooals ook in de publicatie van SCHMAUS en ALBRECHT wordt afgebeeld, n.l. uit de kern spruitende chromatinedeelen, welke een knopvormig verdikt uiteinde vertoonen en door middel van een steel aan de kern zijn verbonden gebleven (z.g. „Sprossungsfigur"). Bij a. is zoo'n uitspruitende, gesteelde knop in het gezichtsveld getroffen; bij b. en c. wijzen deze gesteelde lichaampjes naar den waarnemer toe, zoodat men boven op den knop ziet.

Deze proeven leeren dus, dat overal, waar door kleuring met basische kernkleurstoffen de aanwezigheid van chromatine wordt vermoed, een positieve nuclealreactie tot stand komt. Een zeker bewijs voor deze onderstelling leerde de volgende proef: Praeparaten werden gekleurd met haematoxyline en daarna in canadabalsem ingesloten. Verschillende kernen, waarvan sommige normaal waren, andere bepaalde stadia van degeneratie vertoonden, werden zoo natuurgetrouw mogelijk geteekend. De plaatsen, waar de geteekende kernen zich in het praeparaat bevonden, werd op de kruistafel afgelezen en genoteerd. Daarna werden de praeparaten via xylol en alcoholoplossingen van dalende concentraties in water gebracht en volgens de methode van FEULGEN en ROSSENBECK behandeld. Bij de hydrolyse werd alle haematoxyline uit de weefsels getrokken. Van de op deze wijze behandelde en daarna

in canadabalsem ingesloten coupes werden de genoteerde plaatsen opnieuw met de kruistafel opgezocht. Vergelijkingen met de teekeningen leerden, dat de kernen in het laatste geval volkomen hetzelfde beeld vertoonden als bij de eerste kleuring met haematoxyline. Niet alleen gold dit voor de kernen met normaal uiterlijk, doch ook voor de karyorhectisch uiteengevallen of karyolytisch gedegenereerde kernen. Zelfs de kleinste chromatinedeeltjes (men lette op fig. 7 en 8) of de zich met haematoxyline zeer flauw kleurende kernschimmen geven een duidelijke reactie. Bij vermeerdering of vermindering van hydrolysetijd of hydrolysetemperatuur werd geen toename van positief reageerende kernbestanddeelen gevonden. Evenmin kon een diffuse kleuring van het protoplasma, veroorzaakt door de aanwezigheid van uitgeloogde kernsubstanties, worden waargenomen. Praeparaten, behandeld met zwaveligzure fuchsine zonder voorafgaande hydrolyse, reageeren negatief.

Een bijzonder gedrag van de nucleoli bij de degeneratie kon niet worden vastgesteld. De grootere kernkorrels, die zich, bij kleuring met basische en zure kleurstoffen, sterker tot de laatste voelen aangetrokken, blijken een zwakkere nuclealkleuring te bezitten dan de andere meer basophiele korrels. Bijzonderheden, als het uittreden van nucleoli uit de degenereerende kernen, e. d. konden niet worden waargenomen.

B. Degeneraties optredend aan kernen van geëmigreerde witte bloedlichaampjes.

Door talrijke onderzoekers, in ons land nog onlangs door Feringa (1922), werd vastgesteld, dat na intraperitoneale injectie van verschillende stoffen (o.a. van een physiologische zoutoplossing), emigratie van polynucleaire leucocyten optreedt, welke gedurende eenige uren aanhoudt. Na verloop van 18—24 uur ziet men hoe deze cellen door de inmiddels in het exsudaat opgetreden mononucleaire leucocyten worden gephagocyteerd.

Eigen onderzoek.

Het was mijn bedoeling het lot der kernen van deze gephagocyteerde leucocyten met de nuclealreactie te vervolgen. Daartoe

werd bij een rat 2 cc. van een physiologische zoutoplossing op een temperatuur van 38° C. intraperitoneaal geïnjicieerd. Na verloop van 24 uur werd met behulp van een recordspuit het gevormde exsudaat uit de buikholte gepuncteerd; van dit exsudaat werden uitstrijkpraeparaten gemaakt. Naast de nuclealreactie werden ook kleuringen volgens de panoptische methode van PAPPENHEIM verricht. Behalve enkele gephagocyteerde leucocyten werden vele nog niet gephagocyteerde cellen gevonden, waarvan de kernen verschillende stadia van karyorhectische degeneratie vertoonden. Alle overgangen van sterk gesegmenteerde leucocytenkernen via groote chromatinebrokken, waarin de segmenten uiteengevallen zijn, tot zeer fijne, nog nauwelijks waar te nemen, chromatinekorrels zijn in de cellen zichtbaar. Ook de gephagocyteerde cellen vertoonen dezelfde vormen van kerndegeneratie. Volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandeld, kleuren deze elementen zich duidelijk violet. In het protoplasma van sommige groote mononucleaire leucocyten is een licht-violet gekleurde korreling te zien, welke als laatste rest van de geheel uiteengevallen gephagocyteerde kerndeeltjes moet worden opgevat. In fig. 10 zijn bij a. de brokstukken van een gedegenereerde kern van een nog niet gephagocyteerde leucocyt afgebeeld, waarbij goed te zien is, dat ook de kleinste chromatinedeeltjes een duidelijke positieve nuclealreactie geven. Aan niet-gehydrolyseerde praeparaten, welke aan de inwerking van het fuchsinezwaveligzuur worden blootgesteld, valt nòch een kleuring van chromatinekorrels, nòch een diffuse kleuring van het leucocytenprotoplasma op te merken.

Evenals de sub. A. genoemde uitkomsten leeren dus ook deze, dat zelfs de fijnste deeltjes van het chromatine, waarin de kern bij degeneratie uiteenvalt, duidelijk positief reageeren op de nuclealmethode van FEULGEN en ROSSENBECK, ook indien de kern daarbij de inwerking ondergaat van de fermenten in het protoplasma van een phagocyt.

Veranderingen, welke men met behulp der kleuringen volgens GIEMSA of PAPPENHEIM aan gephagocyteerde kernen ziet optreden, bestaande in het voorkomen van kleurnuances tusschen blauwviolet en rose, welke veroorzaakt worden door toename in kleurbaarheid met de zure bestanddeelen van het kleurmengsel ten

koste van de basische, zijn in de volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandelde praeparaten slechts te herkennen als vermindering in kleurbaarheid met het zwaveligzure fuchsine.

Bijzondere veranderingen in het gedrag der nucleoli konden niet worden aangetoond. Als eindstadium der phagocytose neemt men een diffuus violet gekleurde massa in het protoplasma der phagocyten waar.

C. **Degeneratieve kernveranderingen in een vogelsarcoom.**

Door toevallige omstandigheden kreeg ik de beschikking over een bij een vogel verwijderd gezwel, dat bij microscopisch onderzoek een sarcoom bleek te zijn. In dezen tumor waren talrijke gedegenereerde kernen aanwezig, waaraan, evenals in de beide vorige gevallen, verschillende vormen van degeneratie waren te herkennen. Zoo zijn in fig. 11 bij a. brokstukken van een uiteengevallen kern afgebeeld. Zeer duidelijk was in de praeparaten het type der kernwandhyperchromatose vertegenwoordigd. In fig. 12 vindt men een sterk vergroote kern, waarin zich het chromatine tegen de membraan heeft verdicht, terwijl het centrum tot een kleurlooze massa is geworden. Ook in deze praeparaten kan aan de nucleoli niets bijzonders worden waargenomen.

D. **De kernen in talkklieren en in de daarmee verwante klieren van Meibom en praeputiaalklieren.**

De meest oppervlakkig liggende cellen der talkklieren vormen een directe voortzetting van het stratum cylindricum van het samengesteld plaveiselepitheel der epidermis, dat als buitenste wortelscheede het haar en daarmee ook de talkklier omgeeft. De naar binnen liggende cellen der klier zijn gekenmerkt, doordat het protoplasma vetdroppels bevat, wier grootte en aantal centraalwaarts hoe langer hoe meer toeneemt. Met deze intracellulaire vetvermeerdering gaat tevens een vermindering in kleurbaarheid en een kleiner worden der kern gepaard, welke ten slotte geheel verdwijnt.

Overeenstemmend met den bouw der talkklieren is die der klieren van MEIBOM; ook zij bestaan uit cellen, welke naar het cen-

trum toe eerst hoe langer hoe meer met vetdruppels worden opgehoopt om dan platter te worden en ten slotte te gronde gaan.

Physiologisch en histologisch zijn ook de bij sommige dieren (vooral knaagdieren) voorkomende praeputiaalklieren tot de groep der talkklieren te rekenen.

Over de fijnere histologische veranderingen, welke in de cellen bij de vorming der talkmassa plaats hebben, heerschen nog tegenstrijdige opvattingen. De in het periphere gedeelte der klier voorkomende cellen bevatten korrels, welke door WINKLER en SCHRÖTTER (1890) voor keratohyalinekorrels worden gehouden. Onderzoekingen van ROSENSTADT (1892) hebben de identiteit dezer korrels met het keratohyaline uit de epidermis bevestigd. Volgens dezen onderzoeker veranderen de korrels zich bij het verdere secretieproces zoodanig, dat zij zich anders ten opzichte van bepaalde kleurstoffen gedragen, om ten slotte geheel te verdwijnen. Zijn deze korrels verdwenen, dan blijft een netwerk over, in welks mazen zich nu kleine vetdruppels gaan afzetten, die langzamerhand met elkaar tot grootere druppels vervloeien. De draden van het protoplasmanetwerk vervormen zich daarbij tot een stof, welke vroeger door KOELLIKER (1889) voor plastine werd gehouden, doch volgens ROSENSTADT zou overeenkomen met het keratine in verhoornde cellen. De talkkliersecretie wordt daarom door hem als een soort verhoorningsproces opgevat. Wat de kern betreft, deze zou zich dan ook gedragen als die van verhoornde cellen, d.i. zij zou niet vervetten, doch chromatolytisch degenereeren. Van een uitstooting van chromatinekorrels of nucleoli in het protoplasma wordt door ROSENSTADT geen gewag gemaakt.

Eigen onderzoek.

Onderzocht werden stukjes huid van menschen, oogleden van menschen, praeputiaalklieren van muizen. De fixatie geschiedde in sublimaat, vloeistof van ZENKER, vloeistof van BOUIN. Naast de nuclealreactie werden kleuringen met haematoxyline en eosine, en ijzerhaematoxyline verricht. In al deze gevallen kon duidelijk de chromatolyse der celkern vervolgd worden; alle stadia tusschen normale en geschrompelde, nauwelijks nog te kleuren, kernen waren aanwezig. In fig. 13 ziet men in de praeputiaalklier

van een muis naast normale kernen bij a. geschrompelde en chromatolytische kernen bij b. Praeparaten, welke met haematoxyline en eosine waren gekleurd leverden geen verschil in uitkomst met die, waarop de nuclealreactie was toegepast, d.w.z. met de laatste methode waren niet meer of minder gedegenereerde kernen of kernresten aan te toonen. Ook veranderingen in de wijze van hydrolyse gaven geen betere uitkomsten. Praeparaten, welke zonder voorafgaande hydrolyse gekleurd werden met de vloeistof van SCHIFF, reageerden negatief. Er kon onder geen enkele omstandigheid een violetkleuring buiten de kern of kernresten worden waargenomen.

Men ziet dus, dat de celkernen naar het centrum der klier toe hoe langer hoe meer schrompelen en zich hoe langer hoe minder met zwaveligzure fuchsine kleuren, totdat ten slotte met deze methode niets meer van een kern te herkennen is. Bijzonderheden aan nucleoli werden niet waargenomen; met een vermindering in de algemeene kleurbaarheid van het z.g. kernchromatine gaat tevens een vermindering in kleurbaarheid der nucleoli gepaard.

E. Celkernen in de klier van Harder.

Niet alleen bij zoogdieren, ook bij andere, op het land levende, gewervelde dieren komt een bij de membrana nictitans behoorende klier voor, welke door HARDER het eerst in 1694 bij *Cerviden* werd beschreven, en sindsdien in de anatomie bekend staat onder den naam van : klier van HARDER. Bij den mensch en bij apen ontbreekt zij; bij knaagdieren is zij sterk ontwikkeld. Aan de sterk ontwikkelde klier bij konijnen worden door WENDT (1877) twee gedeelten onderscheiden, een grooter weeker pars rubicunda en een pars albescens; histologisch onderscheiden deze twee gedeelten zich hierdoor, dat het eerste grootere vetdruppels bevat als het tweede. Opvallend is, dat deze twee deelen slechts één gemeenschappelijken uitvoergang bezitten, zooals KAMOCKI (1882—'83) aantoonde.

De klier van HARDER is tubulo-acineus; de acini bezitten een eenlagig epitheel, waarvan de cellen in haar protoplasma talrijke vetdruppels vertoonen.

Ofschoon de klier van HARDER histogenetisch niet tot de talkklieren mag gerekend worden, is zij aan deze, uit een physiolo-

gisch oogpunt bezien, zeer na verwant. Het zou interessant zijn na te gaan, of ook hier de vorming van vetdruppels niet gepaard ging met soortgelijke veranderingen aan de kern, als bij talkklieren wordt waargenomen.

Eigen onderzoek.

De organen, afkomstig van konijnen, caviae en ratten, werden gefixeerd in sublimaat, vloeistof van ZENKER en vloeistof van BOUIN.

In geen enkel geval werden, nòch met behulp der nuclealreactie, nòch met die van histologische kleuringen, aan de kernen veranderingen gevonden, welke op een aandeel der laatsten aan de vorming der secreetmassa wezen. De kernen vertoonen allen een min of meer ronden vorm; zij bezitten een duidelijke kernmembraan en bevatten een structuur, welke geheel overeenkomt met die van kernen in andere weefsels. In het celplasma was na toepassing der nuclealreactie geen violette kleur waar te nemen, ook niet bij verandering van hydrolysetemperatuur en hydrolyseduur, of bij het achterwege laten der hydrolyse.

F. Veranderingen aan de celkernen in de functioneerende mamma.

Ook de celkernen in de melkklier, een orgaan, hetwelk eveneens een vethoudend secreet vormt, zouden veranderingen kunnen vertoonen, analoog aan die in de talkklier.

Voor de vroegere meening, dat de melkproductie uitsluitend zou berusten op een vettige degeneratie der kliercellen, welke vooral gegrond was op onderzoekingen van VIRCHOW, is tegenwoordig de wel algemeen aangenomen opvatting in de plaats gekomen, de melkproductie als een secretie te beschouwen. Onderzoekingen van DUESBERG (1907), HOVEN (1911), ARNOLD (1905—1914) leeren, dat evenals in andere kliercellen ook hier protoplasmastructuren worden gevonden, welke sterk tegen een eenvoudige vettige degeneratie der klierepitheelcellen pleiten. In hoeverre de celkern bij de vorming der secreetproducten een rol speelt, is een nog veel omstreden vraag. Volgens NISSEN (1886) zou bij de secretie een degeneratie der kernen met opvolgende

afstooting naar het lumen plaats hebben. Daarbij zou de normale kernstructuur verloren gaan, de kern in stukken uiteenvallen, welke dan vervolgens uit de cel worden gestooten. Op deze wijze zou het hooge gehalte der melk aan nucleoproteïden te verklaren zijn. Ook MICHAELIS (1898) neemt aan, dat de secretie gepaard gaat met degeneratieve veranderingen aan de kern. Deze veranderingen zouden slechts voor een klein gedeelte plaats hebben in de nog niet uitgestooten kern; in hoofdzaak treden zij echter op in de reeds uitgestooten en in het lumen liggende celkernen. LIMON (1902) heeft in enkele gevallen pyknotische en karyorhectische veranderingen aan de kern waargenomen; ook een uitstooting van celkernen kon wel eens opgemerkt worden. Deze verschijnselen werden echter in zoo geringen graad gezien, dat zij niet als verklaring kunnen dienen voor het hooge gehalte der melk aan nucleoproteïden. Daarnaast staan uitspraken van andere onderzoekers, welke een deelnemen van de kern aan de secretie ontkennen. Zoo trof STEINHAUS (1892) aan de kernen der klierepitheliën geen degeneratieve of andere veranderingen aan, en hij meent verder te mogen besluiten, dat kernbestanddeelen der kliercellen op de een of andere wijze met het secreet worden vermengd. De in het lumen gelegen celkernen worden door dezen, evenals door andere onderzoekers (BIZZOZERO en VASALE 1887; BIZZOZERO en OTTOLENGHI 1899; BENDA 1890; UNGER 1898), niet als epitheelkernen, doch als gediapedeseerde witte bloedlichaampjes beschouwd. Ook ARNOLD (1905—1914) ontkent een deelname van de kern aan de secretie in den vorm van een te gronde gaan dezer lichaampjes, al heeft ook hij wel eens chromatolytische, pyknotische of karyorhectische kernen in de kliercellen waargenomen. Tegen een ondergang der kernen bij de secretie zou vooral pleiten, dat in cellen, welke volgepropt zijn met vetdruppels, altijd kernen met normale kernstructuur worden aangetroffen.

Eigen onderzoek.

Als materiaal voor onderzoek dienden mammae van zoogende vrouwen, welke in formol waren gefixeerd, doch daarna grondig in stroomend leidingwater werden gespoeld.

In de microscopische praeparaten, behandeld volgens de metho-

de van FEULGEN en ROSSENBECK, of volgens histologische methoden, konden aan de kernen der kliercellen min of meer duidelijke structuren worden waargenomen. Van een uitstooten van kernbestanddeelen was niets te zien. Ook degeneratieve veranderingen aan de kernen werden niet opgemerkt, al kleurden sommigen zich ook duidelijker dan anderen. In de lumina der alveolen of melk-buisjes en -gangen waren eveneens celkernen zichtbaar, welke een duidelijke positieve nuclealreactie vertoonen. Ook hier vertoonden sommige kernen een duidelijker structuur dan andere. Of deze kernen moeten worden opgevat als afkomstig van afgestooten kliercellen of van geëmigreerde witte bloedlichaampjes kon niet worden uitgemaakt. Buiten de kernen trad geen positieve nuclealkleuring op, ook niet na verandering van hydrolysetijd of -temperatuur of na weglating der hydrolyse.

G. Veranderingen aan de celkernen van het epididymisepitheel, welke op een secretie zouden wijzen.

Door HAMMAR (1897) zijn aan de epitheelcellen der epididymis bij den hond veranderingen beschreven, die er op zouden wijzen, dat dit orgaan niet slechts een afvoerkanaal is voor de uit den testis komende spermatozoën, doch dat hierin ook secretieprocessen plaats hebben. De veranderingen, die in de cellen werden waargenomen, gaven aanleiding het secretieproces in vier stadia te verdeelen:

1° een stadium van secreetvorming, waarbij in het protoplasma secreetkorrels worden opgehoopt;

2° een secretiestadium, waarbij de cellen haar trilharen verliezen en het secretieproduct aan het lumen van het kanaal afstaan;

3° een stadium, waarin een herstel der cel plaats vindt;

4° een stadium van rust.

Daarna begint het proces weer van voor af aan. Bij de vorming der secreetkorrels zou ook de kern een rol spelen.

Na HAMMAR zijn vooral door HENRY (1900) onderzoekingen verricht op de epididymis van verschillende vertebrata. Evenals de eerst genoemde onderzoeker kon ook HENRY een secretie der epitheelcellen waarnemen en dezelfde vier stadia herkennen. De

kern speelde bij het secretieproces een belangrijke rol. In de praesecretorische phase neemt het volumen der kern in de epitheelcellen toe; daarbij kunnen zich talrijke amitotisch deelen. Deze kerndeelingen dienen niet tot vermenigvuldiging der cel, doch hebben slechts de beteekenis van een vermeerdering van het chromatine, welke tot de vorming der secreetkorrels bijdraagt. Met het optreden van deze, zich met safranine kleurende, korrels in het protoplasma gaat een verandering in de chromophilie der kern gepaard; deze begint zich nu ook meer met safranine te kleuren. De kern vermindert daarbij in volumen; zij staat chromatine aan het protoplasma af, hetzij door exosmose, hetzij door scheuring der kernmembraan; ook fragmentatie valt hierbij dikwijls waar te nemen. Door de afgifte van chromatine vermindert de kleurbaarheid der kern hoe langer hoe meer.

In den laatsten tijd zijn door HEIDENHAIN en WERNER (1924) morphologische onderzoekingen verricht aan de epididymis van den mensch, waarbij uitstooting van protoplasmabolletjes naar het lumen toe kon worden waargenomen, terwijl door REDENZ (1924) een meer histophysiologisch onderzoek verricht werd naar de beteekenis van het secreet van den ductus epididymidis voor de spermatozoën bij verschillende slachtdieren.

Eigen onderzoek.

Hiervoor dienden epididymides van konijnen, ratten en muizen. Behalve een duidelijke kleuring van de aan de basis gelegen kernen van het cylinderepitheel, werd hier en daar een chromatolytische, weinig gekleurde, geschrompelde kern in het meer aan het lumen grenzende deel gevonden. Kernfragmentatie werd niet waargenomen; evenmin het uitstooten van kernkorrels uit de kern in het cytoplasma. In het celplasma kon onder geen enkele omstandigheid (wijziging van hydrolysetemperatuur en hydrolysetijd) het voorkomen van met fuchsinezwaveligzuur positief reageerende bestanddeelen worden aangetoond.

H. **Kernveranderingen in de epitheelcellen van den ductus deferens.**

Ofschoon door velen een secerneerende functie van het epitheel

van den ductus deferens wordt vermoed en door sommigen het voorkomen van secreetkorrels in het protoplasma dier cellen is aangetoond, heeft eerst onlangs WINIWARTER (1925) gemeend een deelneming van de celkern aan de vorming van het secreet duidelijk te kunnen vaststellen. Door hem zijn n.l. in een levenswarm gefixeerden ductus deferens van een patiënt, bij wien wegnemen van dit orgaan noodzakelijk was, secretieverschijnselen waargenomen, waarbij de secreetmassa zelfs uitsluitend door de kern scheen te worden gevormd. In het epitheel werden n.l. naast normale, aan de celbasis gelegen kernen, andere gevonden, meer naar het lumen toe gekeerd, welke in haar karyoplasma meer of minder talrijke, zich vooral met safranine kleurende korrels vertoonden. Naast deze, uitsluitend met safraninophile korrels opgevulde, kernen waren andere aanwezig, waarin behalve korrels ook vacuolen voorkwamen, hetzij tegen de granula aanliggend, hetzij deze geheel omgevend. Bovendien bevatten sommige kernen alleen vacuolen, zonder korrels. Over het ontstaan dezer granula en vacuolen werd het volgende vermeld: Het begin der korrelvorming is hierdoor gekenmerkt, dat in het midden van een kern één enkel safraninophiel granulum ontstaat. In de onmiddellijke omgeving hiervan ziet men nu spoedig andere korrels optreden, niet ontstaan door fragmentatie uit het eerste, doch door een werkelijke nieuwvorming. Hetzelfde proces kan zich op een andere plaats in de kern herhalen, zoodat na eenigen tijd de kern twee of meer groepjes van dergelijke korrels bevat. Deze nemen in grootte toe, zoodat tenslotte de geheele kern er mee is opgevuld. Dit beeld kan gecompliceerd worden door het optreden van vacuolen, al is de aanwezigheid van vacuolen in de kern voor de secreetvorming volstrekt niet noodzakelijk. De vacuolen ontstaan eerst dan, als de korrels reeds gevormd zijn. Gedurende de intranucleaire korrelvorming verplaatst de kern zich tevens naar het vrije uiteinde der cel; zij legt zich tegen het oppervlak aan en in gunstige gevallen ziet men de uitstooting der granula van uit de kern direct in het lumen. Een enkele maal ziet men ook, dat zij eerst in het celplasma worden uitgestooten; de kernmembraan vertoont dan een scheur, waaruit de korrels in het plasma treden. Gewoonlijk echter worden zij van uit de kern direct in het lumen gesecerneerd.

De secreetvorming gaat niet gepaard met een degeneratie der kern; na haar inhoud geledigd te hebben, regenereert zij zich weer. Langen tijd echter is dit verlies aan materiaal nog te herkennen aan de aanwezigheid van intranurleaire vacuolen zonder morphologisch aantoonbaren inhoud.

Wat de genese der korrels betreft, al lijkt op het eerste gezicht het ontstaan er van uit bestanddeelen der nucleoli het meest aannemelijk, zoo moet deze veronderstelling toch stellig van de hand worden gewezen. Gedurende het geheele secretieproces blijven de nucleoli n.l. duidelijk zichtbaar, zonder een enkel kenteeken te vertoonen, hetwelk op een eventueel substantieverlies zou kunnen wijzen. De granula kleuren zich, na fixatie in het mengsel van HOLLANDE (1922) en kleuring met haemateïne en safranine, bovendien anders als de nucleoli; terwijl de laatste violet worden gekleurd, zijn de korrels sterk rood getint. Aangezien verder het chromatine gedurende de secretie sterk in hoeveelheid afneemt, is dus de eenige mogelijkheid, dat de korrels uit dit laatste gevormd worden.

Het eigenaardige van dit door WINIWARTER beschreven secretieproces is dus, dat de secretiemassa van uit de kern niet eerst via het protoplasma, doch direct in het afvoerkanaal wordt uitgestooten, en dat bovendien de secreetkorrels niet van de nucleoli, doch van het chromatine afkomstig zijn.

Eigen onderzoek.

De beste resultaten worden volgens WINIWARTER verkregen, indien de stukjes weefsel in de vloeistof van HOLLANDE zijn gefixeerd; na het gebruik van andere fixatieven zouden de beelden veel onduidelijker zijn. Ik gebruikte daarom, naast andere vloeistoffen (sublimaat, fixatief van BOUIN, fixatief van ZENKER) vooral het mengsel van HOLLANDE als fixatiemiddel.

Het *fixatief van* HOLLANDE (1918; 1922) bestaat uit:

pikrinezuur	4 gr.
neutraal koperacetaat	2,5 gr.
formol	10 c.c.
ijsazijn	1,5 c.c.
aqua destillata	100 c.c.

De fixatieduur bedraagt 5—10 dagen. Daarna komen de or-

ganen gedurende 24—48 uur in stroomend water. Insluiting geschiedt in paraffine.

Het mengsel van HOLLANDE bestaat dus eigenlijk uit de vloeistof van BOUIN met een veel grooter gehalte aan pikrinezuur. Terwijl in de laatste 0,6 gr. pikrinezuur per 100 c.c. water aanwezig is (verzadigde oplossing), is, dank zij de aanwezigheid van het koperacetaat het gehalte tot 4 gr. pikrinezuur per 100 c.c. water opgevoerd. Dit mengsel van HOLLANDE zou een grooter indringsnelheid hebben dan dat van BOUIN; door het aanwezige koperacetaat zouden de nucleoproteïden, die dikwijls rijk zijn aan calciumzouten, beter gefixeerd worden.

Onderzocht werd de epididymis van honden, konijnen en ratten.

Als uitkomst der proeven kan worden meegedeeld, dat nòch na fixatie in de vloeistof van HOLLANDE, nòch na fixatie in andere vloeistoffen beelden zijn verkregen, welke overeenkomen met de door WINIWARTER beschrevene. Wel werden, evenals in de epididymis, kernen gevonden, meer naar het lumen toe gelegen, die er chromatolytisch en geschrompeld uitzagen en zich soms sterker met zure kleurstoffen (safranine, eosine) als met basische kleurden. De aanwezigheid van safraninophiele korrels in de kern en het uittreden van deze direct in het lumen of in het protoplasma kon echter niet worden opgemerkt. Met de nuclealmethode vertoonen de praeparaten dezelfde beelden, als voor de epididymis is meegedeeld. De naar het lumen toe gekeerde cellen zijn geschrompeld en weinig kleurbaar. Van een inscheuring in de kernmembraan of van een uittreden van korrels uit de kern is niets te bespeuren.

I. Morphologische veranderingen aan de celkernen in de bekkenklier van salamanders gedurende de secretie.

De accessorische klieren van het urogenitaalapparaat, welke bij salamanders rondom de cloaca voorkomen, worden sedert de onderzoekingen van HEIDENHAIN (1890) in drie groepen verdeeld. Wel had reeds lang te voren DUVERNOY een soòrtgelijke indeeling voorgesteld, doch door de meeste onderzoekers was op deze mededeeling geen acht geslagen, zoodat vóór 1890 slechts twee accessorische geslachtsklieren onderscheiden werden: een *cloacaklier* en een *bekkenklier*. HEIDENHAIN meende op grond van histolo-

gische en histogenetische onderzoekingen aan de laatste klier twee gedeelten te kunnen onderscheiden, een gedeelte van het ectoderm afkomstig, waaraan hij den naam van *buikklier* gaf, en een gedeelte ontstaan uit het entoderm, dat in het vervolg den naam van *bekkenklier* zou dragen.

Deze bekkenklier en de veranderingen, die de cellen van dit orgaan gedurende de secretie ondergaan, zijn voor HEIDENHAIN het onderwerp van een uitvoerig histologisch onderzoek geworden. Morphologisch bleken bekken- en cloacaklier volkomen denzelfden bouw te bezitten en ook gedurende de secretie vertoonden de cellen van beide klieren dezelfde veranderingen in haar protoplasma. De bekkenklier is een tubuleuse klier, waarvan de tubuli zich nooit vertakken. De buisjes vertoonen twee scherp van elkaar gescheiden gedeelten: een secerneerend eindstuk en een uitvoergang. De laatste bestaat steeds uit een laag van platte epitheelcellen, omgeven door een laagje van circulair verloopende gladde spiercellen, terwijl het secerneerend gedeelte een buitengewoon wisselend beeld oplevert, al naar gelang van het stadium der secretie, waarin zich de cellen bevinden.

Al vormen de veranderingen, welke in het protoplasma der kliercellen optreden, ook een buitengewoon interessant gedeelte van het onderzoek, van meer belang moeten voor ons geval de veranderingen zijn, welke de celkernen vertoonen. Terwijl in cellen, waarvan, op grond van het ontbreken van bepaalde protoplasmastructuren, moet worden aangenomen, dat zij weinig of niet functioneeren, een ronde of ovale kern aanwezig is, ziet men, dat de kern plat wordt of uitstekende hoeken vertoont bij toename der secretiefunctie (kenbaar aan het voorkomen van een wijdmazig netwerk in het protoplasma, dat over het geheele cellichaam verspreid is en waarin zich secreetgranula bevinden). Indien de cel na het uitstooten der secreetmassa tot de regressieve phase is teruggekeerd en met de vorming van nieuw protoplasma begint, keert de kern tot haar oorspronkelijk ronden vorm terug.

Eigen onderzoek.

Van mannelijke exemplaren van *Triton taeniatus* werden, zoowel vóór als in den paartijd, de cloaca met de daaromheen

liggende klieren gefixeerd in verzadigde waterige sublimaatoplossing, en vervolgens in paraffine ingesloten.

Het microscopisch onderzoek wijst uit, dat in de verschillende phasen der secretie de celkernen allerlei overgangen toonen van een rond of ovaal lichaam met een duidelijke kernmembraan en structuren, zooals die in vele andere kernen worden waargenomen, tot kernen van grillige gedaante, waar aan den kant, welke naar het lumen is gekeerd geen membraan meer te herkennen is en waar het uitstooten van deeltjes uit de kern duidelijk kan worden waargenomen.

In fig. 14 ziet men, hoe die zijden der kernen, welke naar het lumen zijn gericht, als uitgerafeld schijnen. Een kernmembraan aan die zijden is in de meeste gevallen niet te herkennen (men lette o.a. op fig. 14 a.; fig 15 a. en b.). Bovendien worden nucleïnezuurhoudende deeltjes (positieve nuclealreactie) uit de kern aan het protoplasma afgestaan (men zie fig. 14 b. en c.). Ook in fig. 15, een photo genomen bij sterkere vergrooting, is te zien hoe de celkern bestanddeelen aan het protoplasma afstaat; bij a. en b. is de kernmembraan verdwenen en ziet men breede uitloopers van kernsubstantie geleidelijk in het protoplasma overgaan; bij c. neemt een kern onder totale deformatie aan de secreetvorming deel. Sommige korrels worden als zoodanig uit het protoplasma met de secreetmassa in het lumen afgezonderd, zoodat ook hier enkele violet gekleurde korrels teruggevonden worden. De meeste echter worden in het celplasma uitgeloogd. Men kan in enkele gevallen in de secreetmassa, welke zich in het lumen bevindt, een diffuse licht-violette kleur waarnemen; deze kleuring treedt niet op, indien de hydrolyse is achterwege gelaten. De substantie, die zich hier bevindt en een positieve nucleal-reactie vertoont, kan dus zeer waarschijnlijk als een nucleïnezuur, verwant aan het thymonucleïnezuur, worden opgevat. Bij korter durende hydrolyse of hydrolyse bij lagere temperatuur treedt de reactie meestal iets duidelijker op. De hoeveelheid nucleïnezuur, welke zich hier bevindt, is dus waarschijnlijk zóó gering, dat een normale hydrolyse van vier minuten bij 60° C. reeds voldoende is om deze stof tot lagere afbraakproducten dan het nucleal af te breken.

Zonder voorafgaande hydrolyse wordt nergens, binnen of buiten de kliercellen, een positieve reactie aangetroffen.

J. De celkernen in de giftklieren van Amphibia.

Door NICOGLU zijn, in samenwerking met HEIDENHAIN (1907) de giftklieren, voorkomend in de huid van tritonen, aan een uitvoerig onderzoek onderworpen. In deze klieren komen groote cellen voor, door LEYDIG reuscellen genoemd, waarin het secreet in den vorm der z.g. giftkorrels gevormd wordt. Bij deze secreetproductie gaat de geheele cel te gronde, om door andere, bij den hals der klier gelegen cellen, door HEIDENHAIN kiemcellen genoemd, vervangen te worden.

Terwijl de genese dezer korrels uitvoerig onderzocht is en aangetoond kon worden, dat zij, in tegenstelling met andere secreetkorrels, niet door de cel worden afgescheiden, doch veel meer uit het degenereerende celplasma ontstaan, werd op het gedrag der kern bij dit proces slechts weinig acht geslagen. Men vindt alleen vermeld, dat bij de secretie met het protoplasma ook de celkernen degenereeren. Uit de verschillende afbeeldingen is van de degeneratie der kernen weinig te zien.

De meening van GALEOTTI (1895), gegrond op onderzoekingen aan huidgiftklieren van *Spelerpes*, en die van VIGIER (1900) betreffende de huidgiftklieren van *Triton*, volgens welke de secreetgranula in de kern zouden worden gevormd om dan in het protoplasma te worden uitgestooten, wordt door HEIDENHAIN ten sterkste bestreden. In het algemeen toch kon de laatstgenoemde, als resultaat van een onderzoek op verschillende klieren, een direct aandeel van de celkern aan de vorming van secreetkorrels nergens waarnemen.

Eigen onderzoek.

Onderzocht werden gedeelten der huid van tritonen en kikvorschen, welke in sublimaat en in de vloeistof van KINGSBURY waren gefixeerd. Bij het microscopisch onderzoek ziet men naast verschillende slijmklieren, klieren, welke opvallen door haar grootte en door de aanwezigheid van korrels, welke zich sterk kleuren met ijzerhaematoxyline van HEIDENHAIN of met fuchsine bij kleuring volgens de methode van KOPSCH. Past men de nuclealreactie toe, dan ziet men, dat deze korrels het zwaveligzure fuchsine niet hebben gekleurd; van een violette kleuring der secreetmassa kon nergens iets worden waargenomen. Wel wer-

den soms kernen in de secreetmassa aangetroffen, die van de aan den wand der klier liggende cellen schenen te hebben losgelaten.

K. De celkernen in de cementklier van Scalpellum.

Door KRÜGER (1923) werd onlangs meegedeeld, dat in de cementklier van Scalpellum (behoorend tot de orde der Cirripediën, in Holland niet voorkomend, doch nauw verwant aan de bij ons inheemsche eendenmossel) het cement, een secreet, dat in vloeibaren toestand wordt uitgescheiden, doch buiten de klier tot een harde massa versteent, waardoor het dier zich aan bepaalde voorwerpen kan vasthechten, uitsluitend door de celkern zou worden geleverd. Het begin der secretie is daaraan te herkennen, dat de nucleolus in de kern sterk in grootte toeneemt. Weldra treden aan de oppervlakte uitpuilingen op, die tot uitloopers groeien; in het centrale gedeelte ontstaan vacuolen. Behalve een toename in grootte treedt ook een vermeerdering in aantal op. Naast den aanvankelijk enkelvoudig voorkomenden nucleolus treden er meer op; er kunnen er zooveel ontstaan, dat het nauwelijks meer mogelijk is het aantal in een kern vast te stellen. De gestalte der nucleoli is een zeer wisselende; meestal nemen ze langgestrekte vormen aan; de nucleolenuitloopers zijn dan naar dien kant van de cel gericht, waar zich de uitvoergang bevindt. Zij schijnen de eigenschap te bezitten lytisch op de kernmembraan in te werken; overal tenminste, waar ze deze laatste aanraken, is geen membraan meer te herkennen, en de uitloopers kunnen zoo direct in het protoplasma overgaan en daar de secreetmassa vormen. Hetgeen de celkern hierdoor aan nucleolairsubstantie verliest, wordt aangevuld door vorming van andere nucleoli. Naast langgestrekte nucleoli werden in de kern ook hoekige of knotsvormige aangetroffen. In het protoplasma kunnen nog langen tijd groote gedeelten van deze lichaampjes worden waargenomen.

Eigen onderzoek.

Door de vriendelijkheid van Dr. DE BEAUFORT werd ik in staat gesteld exemplaren van *Scalpellum Stroemii*, uit IJsland af-

komstig, microscopisch te onderzoeken. De dieren waren waarschijnlijk gefixeerd in alcohol, werden thans in 70% alcohol bewaard en bevonden zich in uitstekend geconserveerden toestand. De harde chitinelaag en het harde cement, waarmee de dieren zich aan allerlei voorwerpen hadden vastgehecht, en die het snijden met het microtoom onmogelijk zouden maken, werden geweekt in een 5% oplossing van trichloorazijnzuur of in diaphanol.

De cellen der cementklier zijn gekenmerkt door haar buitengewone grootte. De kernen bieden een sterk wisselend beeld, overeenkomend met wat door KRUGER hierover werd meegedeeld. Naast kernen met vacuolen, die haar een blazig uiterlijk verleenen, werden andere gevonden met oogenschijnlijk normale structuren en weinig nucleoli. Evenals KRUGER beschrijft, kon worden waargenomen, hoe in vele kernen het aantal nucleoli en daarmee de hoeveelheid nucleolussubstantie aanzienlijk toeneemt. Bij safranine-lichtgroenkleuring ziet men de kern soms geheel en al door het safranine gekleurd, terwijl van een groene tint slechts weinig is waar te nemen.

Na toepassing der methode van FEULGEN en ROSSENBECK treft men, behalve op die plaatsen, waar zich vacuolen bevinden, een violette fijn-gekorrelde massa, over de geheele kern uitgespreid, aan. Aan sommige gedeelten van de kern is nog iets van een kernmembraan te herkennen; op vele plaatsen echter is deze nòch met histologische kleurmethoden, nòch met de nuclealreactie aan te toonen. In deze gedeelten ziet men een afstroomen van violet gekleurde korrels en diffuus-violet gekleurde massa naar het protoplasma. Ook hierin is een lichtviolette diffuse tint waar te nemen. Deze protoplasmakleuring is het sterkst, wanneer men een iets minder sterke hydrolyse toepast als gewoonlijk wordt uitgeoefend; na sterkere hydrolyse is deze massa spoedig niet meer aantoonbaar. Blootstelling der praeparaten aan de inwerking van het zwaveligzure fuchsine, zonder voorafgaande hydrolyse, heeft een negatieve uitkomst der reactie ten gevolge, zoowel in de kern als in het cytoplasma.

In fig. 16 ziet men het beeld van de fijnkorrelige kernmassa, welke met de nuclealreactie verkregen wordt. Een duidelijke afgrenzing der kern tegenover het celplasma is niet waar te nemen. In het protoplasma bevindt zich verder een diffuse, licht-

violet gekleurde massa; hier en daar ziet men zelfs korrels in het plasma. In fig. 17 zijn bij a. groote holten in de kern afgebeeld. Bij b. kan duidelijk de overgang van uit granula bestaande kernuitloopers in het protoplasma worden waargenomen; aan dezen kant der kern is de membraan verdwenen, welke aan de andere zijde nog duidelijk te herkennen is. Bij c. ziet men een afgesnoerd korrelig gedeelte der kern, positief reageerend met het reagens van SCHIFF, in het celplasma liggen.

Indien de praeparaten gekleurd worden met safranine en lichtgroen, ziet men, hoe niet alleen de geheele kern, doch ook het celplasma een sterk roode kleur hebben aangenomen. Van een groene tint, waarmee het chromatine zou worden aangetoond, is weinig te bespeuren. In de met haematoxyline en eosine gekleurde praeparaten ziet men, hoe celkern en celplasma diffuus roodviolet gekleurd zijn; de grens tusschen de eerste en het laatste wordt aangegeven door de donkerder kleur van de celkern. De structuur van het kernchromatine is hier door de groote hoeveelheid nucleolussubstantie geheel verborgen. De nuclealreactie geeft bij geringe hydrolyse eveneens een diffuse kleuring van protoplasma en kern, na sterkere hydrolyse verdwijnt de diffuse kleur hoe langer hoe meer, terwijl de korrelige structuur van de kern duidelijk voor den dag treedt.

Men kan op grond van deze beelden met groote waarschijnlijkheid vermoeden, dat gedurende de secretie in de kern veel nucleolussubstantie ontstaat; of dit geschiedt ten koste van het kernchromatine is niet uit te maken. Deze nucleoli komen, over de geheele kern verspreid, voor òf in den vorm van bepaalde lichaampjes (de eigenlijke nucleoli) òf meer in vloeibaren toestand en veroorzaken met de nuclealreactie de diffuse licht-violette kleur, omdat, met de nucleolussubstantie gemengd, ook nucleïnezuur voorkomt. Bij de fixatie worden beiden neergeslagen; het nucleïnezuur veroorzaakt dan de diffuse kleur na toepassing der reactie van FEULGEN en ROSSENBECK. Daarnaast komt het nucleïnezuur voor gebonden aan de z.g. chromatinekorrels. Bij de secretie heeft nu ook een afgifte van nucleïnezuur uit de kern aan het protoplasma plaats, òf als vloeibare massa, tezamen met de nucleolussubstantie, òf in gevormden toestand als z.g. chromatinekorrels.

L. Kernveranderingen in de epitheelcellen van den tractus intestinalis bij Sphaeroma en Idothea.

Uitvoerig zijn door MAZIARSKI (1910) de veranderingen onderzocht, welke in de epitheelcellen van den tractus digestivus der marine Isopoden *Sphaeroma, Idothea* en *Woshea* in verschillende functiestadia aan de celkern optreden. Daarbij bleek, dat de kern een belangrijke rol bij de vorming der sekreetkorrels speelt. Terwijl zij gewoonlijk een korrelige structuur vertoont, ontstaan gedurende de secretie intranucleair kleinere of grootere holten, veroorzaakt door de afgifte van chromatine aan het cytoplasma, waardoor de korrelige structuur in een netvormige of vacuolaire wordt veranderd. De afgifte van chromatine aan het protoplasma kan geschieden in den vorm van korrels, of in opgelosten toestand.

De veranderingen, welke gedurende de secretie in de morphologie der kern plaats hebben, zouden in de eerste plaats veroorzaakt worden door het linine. Deze substantie ondergaat n.l. veranderingen, waardoor zij in het eene geval den vorm van korrels, in het andere die van draadjes of vacuolen aanneemt. Het „chromatine" daarentegen moet worden opgevat als een stof zonder structuur, die het linine slechts impregneert. Verder meent MAZIARSKI, dat het linine identiek is aan het celplasma. Een kernmembraan is niet aanwezig. De kern zou zich dus alleen door de aanwezigheid van nucleïnen van het overige cytoplasma onderscheiden. Dat het verschil tusschen kern en overig celplasma niet groot is, zou bewezen worden door den overgang van nucleïnen uit de eerste in het laatste. Daarmee is dus de hypothese gerechtvaardigd, dat de kern geen speciaal orgaan van de cel is, doch slechts een gedeelte van het protoplasma, waarin zich nucleïne (chromatine) heeft afgezet. De nucleolus zou beschouwd moeten worden als een orgaan, dat uit het protoplasma het nucleïne kan vormen.

Eigen onderzoek.

Door de welwillendheid van prof. R. DOHRN, directeur van het Zoölogisch Station te Napels, was het mij mogelijk de onderzoekingen van MAZIARSKI te herhalen en den tractus intestinalis der Isopoden *Sphaeroma* en *Idothea* met behulp der nucleal-

reactie te onderzoeken. De dieren waren, direct na vangst, eenige uren in sublimaat gefixeerd en in alcohol van 70% naar Holland verzonden. Onder het binoculair microscoop werd de darm uitgepraepareerd en tot paraffinecoupes verwerkt. Daarnaast werden de dieren in toto gedurende eenige uren in diaphanol geplaatst, tot het chitinepantser geheel week was geworden en vervolgens in paraffine ingesloten.

Het microscopisch onderzoek leert, dat, in tegenstelling met de vorige klieren, de celkernen der darmepitheelcellen de normale ronde of ovale vormen vertoonen, welke kernen gewoonlijk bezitten, en door een kernmembraan duidelijk van het protoplasma zijn afgegrensd (in tegenstelling met MAZIARSKI). De kern vertoont een korrelige structuur, zoowel na kleuring met gewone kernkleurstoffen als na toepassing der nuclealreactie. Van een uitstooting van korrels uit de kern of van een uitzending van breede uitloopers naar het protoplasma toe kon niets worden waargenomen. Wel werd in vele gevallen aan dien kant der kern, welke naar het lumen is gekeerd, een lichter gedeelte waargenomen, vergeleken met de overige kernmassa; de korrels zijn hier minder dicht op elkaar geplaatst, terwijl men bovendien den indruk krijgt, dat zij zich, na behandeling volgens FEULGEN en ROSSENBECK minder sterk met het zwaveligzure-fuchsine hebben gekleurd. In het protoplasma is in verschillende cellen een lichtviolette kleur waar te nemen. Zonder voorafgaande hydrolyse ziet men nergens een paarse kleur optreden.

Op grond van deze beelden zou men geneigd zijn aan te nemen, dat er een diffusie van nucleïnezuurhoudende substantie van uit de kern naar het protoplasma plaats vindt. Door MAZIARSKI zijn beelden als hierboven beschreven, eveneens waargenomen en afgebeeld; ook deze onderzoeker tracht ze te verklaren door aan te nemen, dat er een diffusie van chromatine uit de kern naar het celplasma toe plaats grijpt. Vacuolen in de celkernen konden evenwel in mijn praeparaten niet worden aangetroffen.

M. Veranderingen in de celkernen van spinklieren bij rupsen gedurende de secretie.

Reeds door GILSON (1890) was aangetoond, dat de celkernen

in de spinklieren van rupsen een actieve rol speelden bij de vorming van het secreet. Niet alleen in het protoplasma, ook in de kern zelf konden n.l. secreetkorrels worden aangetoond. Latere onderzoekingen van KORSCHELT (1896, 1897), MEVES (1897) en MAZIARSKI (1911) hebben deze uitkomsten bevestigd. Terwijl KORSCHELT aanneemt, dat het het kernchromatine is, dat aan het totstandkomen der secreetmassa een belangrijk aandeel heeft, meenen MEVES en MAZIARSKI, dat juist aan de nucleoli deze rol moet worden toegekend. Volgens de beide laatste onderzoekers komen in de grillig gevormde, van uitloopers voorziene, celkern der spinklier kleine en groote korrels voor. Op grond van hun gedrag tegenover kleurstoffen moeten de eerste als chromatinekorrels, de laatste als nucleoli worden beschouwd. Gedurende de secretie worden nucleoli òf in den vorm van deze grootere korrels, òf in meer vloeibaren toestand uit de kern naar het celplasma afgescheiden. Bij toename der secretie neemt ook het aantal nucleoli in de kern sterk toe, in den vorm van lange uitstulpingen kunnen ze dan aan het protoplasma worden afgestaan. Er kan zelfs reeds in de kern een prosecreet uit de nucleoli gevormd worden.

MAZIARSKI acht het niet onwaarschijnlijk, dat wellicht ook de chromatinekorrels aan de vorming van het secreet meedoen; doch dan stellig in zeer geringe mate.

Eigen onderzoek.

Exemplaren van de *Heispinner* (*Lasiocampa Quercus*) werden in hun geheel in sublimaat en in de vloeistof van ZENKER gefixeerd. Wanneer de dieren zich in 70% alcohol bevinden, worden onder het binoculair microscoop de beide draadvormige spinklieren uitgepraepareerd en deze verder tot paraffinecoupes verwerkt.

Bij het microscopisch onderzoek valt ook hier, evenals in de vorige klieren, de grootte der cellen en celkernen op. Evenals de aangehaalde onderzoekers trof ook ik in mijn praeparaten zeer grillige vormen der celkernen aan. In tegenstelling echter met de mededeelingen van MEVES en MAZIARSKI, dat gedurende de secretie een groote ophooping van nucleoli in de kern zou plaats hebben, kon ik in mijn praeparaten, nòch met kleuringen vol-

gens BIONDI, nòch met haematoxyline en eosine of met safranine en lichtgroen, de aanwezigheid van deze nucleoli vaststellen. Wel werden intranucleair groote lichaampjes gevonden, welke morphologisch volkomen op nucleoli gelijken, doch welke zich verder als het z.g. kernchromatine gedragen, d.w.z. zich met die kleurstoffen kleuren, welke door het laatste worden aangetrokken. Past men de nuclealreactie toe, dan ziet men ook in deze gevallen de nucleoli sterk violet gekleurd. De overige nucleïnezuurhoudende kernbestanddeelen zijn in den vorm van kleine paarse korrels zichtbaar. Van een kernmembraan is in de meeste gevallen niets te bespeuren; men ziet een direct overloopen van fijne violette korrels uit de kern in het celplasma. In dit laatste worden de korrels verder tot de secreetmassa verwerkt; men treft in het plasma n.l. nog een licht-violette kleur aan, welke bij geringere hydrolyse duidelijker optreedt. Ook het in het lumen liggend secreet kan een licht-paarse kleur vertoonen. In die cellen, waar het protoplasma sterk positief reageert, blijken de kernen meestal vacuolen te bezitten, waardoor zij een blazig uiterlijk verkrijgen. Worden de coupes direct aan het reagens van FEULGEN en ROSSENBECK blootgesteld, zonder eerst gehydrolyseerd te zijn, dan ziet men nergens een positieve reactie optreden.

Deze uitkomsten pleiten dus volkomen voor de opvatting van KORSCHELT, dat in de cellen van de spinklier bij de secretie nucleïnezuurhoudende massa („chromatine") uit de kern in het celplasma wordt afgescheiden, welke hier meehelpt aan de vorming van het secreet.

N. Het uittreden van nucleoli uit de celkern.

Het uittreden van nucleoli uit de kern door de kernmembraan heen in het celplasma werd door verschillende onderzoekers waargenomen. Voor een deel zijn deze beelden zeker als kunstproducten op te vatten, omdat het uittreden der nucleoli mechanisch veroorzaakt wordt, doordat zij bij het snijden van coupes worden meegesleurd door het microtoommes. Voor een ander deel echter zouden deze beelden berusten op een werkelijk uittreden van nucleoli uit de kern gedurende het celleven; de in het protoplasma gelegen lichaampjes zouden dan dienen voor

de vorming van bepaalde stoffen. Zoo meenen MAY en WALKER (1908), dat, ofschoon in de meeste gevallen, welke men waarneemt, het uittreden van nucleoli veroorzaakt werd door de mechanische werking van het microtoommes, er enkele gevallen overblijven, waarbij een werkelijk actief uittreden heeft plaats gevonden, omdat zich in deze gevallen de buiten de kern liggende nucleoli anders kleuren dan de intranucleaire. Andere onderzoekers meenen, dat alle buiten de kern liggende nucleoli als kunstproducten zijn op te vatten. HEIDENHAIN (1907) schrijft hierover in zijn „Plasma und Zelle" (blz. 180): „Oftmals habe ich beobachtet, dasz bei den Körperzellen die Nukleolen durch Fixierung und Einbettung steinhart werden; daher ereignet es sich im äuszersten Falle, dasz die Schneide des Messers die Nukleolen aus der Kernstruktur herausreiszt und sie in den Zelleib hinein verschleppt. Dann trift man den Weg, den der Nukleolus genommen hat, in Form einer durch die Kernstruktur hindurchgerissenen Strasze. Einschlägige Beobachtungen sind teils richtig erkannt (MACALLUM), teils miszverstanden worden (OGATA)".

Vooral de cellen uit het pancreas zijn, wat het uittreden der nucleoli betreft, voor velen een voorwerp van onderzoek geweest. Zoo werd door OGATA (1883) de opvatting verdedigd, dat in de cellen van het pancreas bij den mensch, de nucleolus uit de kern zou treden en in het protoplasma tot nevenkern („Nebenkern") zou worden. Tot dezelfde uitkomst leidden ook de onderzoekingen van GALEOTTI (1895) voor de pancreascellen bij *Spelerpes;* ook hier zou de nucleolus uit de kern treden en als nevenkern blijven bestaan. Door MACALLUM (1891) werd eveneens het uittreden van nucleoli uit de kern in pancreascellen waargenomen; de meening echter, dat deze in het protoplasma tot nevenkern zou worden, in twijfel getrokken. VER EECKE (1895) zag, hoe in pancreascellen van kikkers en honden de nucleoli door de kernmembraan heenboren; deze extranucleair gelegen nucleoli zouden dan tot een nieuwe kern uitgroeien, welke naast de oorspronkelijke moederkern komt te liggen. MELISSINOS en NICOLAIDES (1889) konden, naar zij meedeelen, na pilocarpine-injecties in de pancreascellen van honden in sterkere mate het uittreden van nucleoli waarnemen. Ditzelfde verschijnsel werd ook door BABKIN,

RUBASCHKIN en SZAWITSCH (1909) waargenomen; de nucleoli zouden in het protoplasma tot nevenkern worden. Een vermeerdering in aantal der nevenkernen in pancreascellen bij versterkte functie van de klier vermelden ook EBERTH en MULLER (1892). Evenwel zouden volgens hen deze nevenkernen niet als uitgetreden nucleoli moeten worden beschouwd, doch als gezwollen protoplasmatische structuren, die in geen enkel opzicht met de kern in verband staan. Ook door PLATNER (1889) worden de z.g. nevenkernen niet voor uitgetreden nucleoli gehouden; een uittreden van deze lichaampjes uit de kern der pancreascellen zou volgens dezen onderzoeker zelfs in het geheel niet plaats hebben.

WALKER en TOZER (1909) meenen een actief uittreden van nucleoli aan verschillende cellen te hebben waargenomen; zoo b.v. aan leucocyten, voorkomend in den wand van den dunnen darm bij caviae. Een kratervormige inzinking in de kernmembraan duidt daarbij veelal de plaats aan, waar de nucleolus is uitgetreden. Terwijl de intranucleair gelegen nucleoli sterk het methyleenblauw aantrekken, verliezen de buiten de kern gelegen lichaampjes deze eigenschap, om zich nu met fuchsine of oranje G. te kleuren.

Een uittreden van nucleoli uit de celkern en een overgang tot secreetmassa is het sterkst door MONTGOMERY (1899) verdedigd, vooral op grond van onderzoekingen aan de huidklier van *Piscicola*. In kleine cellen, waar men in het protoplasma nog geen sekreetkorrels aantreft, bevindt zich slechts één nucleolus in de celkern. In de nu optredende prophase, d.w.z. in dat stadium, waar het secreet in de kliercellen wordt gevormd en opgehoopt, begint zich het protoplasma, het eerst rondom de kern, te verdichten, om vervolgens in korrels uiteen te vallen. Gelijktijdig neemt de kern sterk in grootte toe en zendt daarbij uitloopers in het protoplasma, welke hier onderling met elkaar in verbinding treden en een netwerk vormen. De toename in grootte der kern berust in hoofdzaak op de geweldige vermeerdering der nucleolussubstantie. De oorspronkelijk enkelvoudig voorkomende nucleolus wordt eerst staafvormig uitgerekt, valt dan in eenige stukken uiteen, die op hun beurt grooter worden en opnieuw uiteenvallen. Heeft de kern haar grootste afmeting

bereikt, dan kunnen er tot driehonderd nucleoli in aangetroffen worden. Wanneer nu de verdichte protoplasmamassa in korrels uiteen gaat vallen, trekt de kern haar uitloopers terug, perst op deze wijze de nucleoli in het protoplasma en neemt daarbij aanzienlijk in grootte af. Het eerst worden de aan de peripherie liggende nucleoli uit de kern gedrukt; pas later komen de meer centraal gelegene aan de beurt, totdat slechts enkele, soms zelfs één, nucleolus in de kern achterblijft. De nucleoli in het protoplasma onderscheiden zich van die, welke in de kern gelegen zijn, door een ander gedrag tegenover kleurstoffen; blijkbaar ondergaan zij hier dus physische of chemische veranderingen. Is het cellichaam nu volgepropt met nucleolussubstantie en protoplasmakorrels, dan begint de metaphase, bestaande in het uitstooten der secreetmassa naar buiten.

Dit uitvoerig onderzoek van MONTGOMERY is gevolgd door een niet minder uitvoerig onderzoek van JÖRGENSEN (1913), welke echter tot geheel andere resultaten is gekomen. Hetgeen de eerstgenoemde als een netwerk van kernuitloopers in het protoplasma beschouwt, zou volgens den laatstgenoemden niets anders zijn dan het reticulair gebouwde prosecreet, dat in het protoplasma gevormd wordt en met de kern niets heeft uit te staan. Niet alleen kon dit morphologisch worden vastgesteld, ook chemisch (verteringsproeven met trypsine) bleek dit prosecreet uit geheel andere stoffen te bestaan dan die, waaruit de kern is opgebouwd. De soms aanwezige kleine oneffenheden aan het kernoppervlak beschouwt JÖRGENSEN niet als kernuitloopers, doch als kunstproducten, welke aan een slechte fixatie te danken zijn.

Eigen onderzoek.

Door bemiddeling van Dr. DE BEAUFORT kreeg ik eenige exemplaren van de op snoeken parasiteerende *Piscicola geometra* ter onderzoek. Helaas was de conserveeringstoestand, waarin de dieren verkeerden, een dusdanig slechte (zij waren waarschijnlijk in 70% alcohol gefixeerd en hadden tientallen van jaren in deze vloeistof gelegen), dat uit de microscopische beelden, welke met de nuclealreactie of met histologische kleurmethoden verkregen werden, geen betrouwbare conclusies konden worden getrokken.

Naast deze proeven op de huidklieren van *Piscicola* werd een onderzoek verricht om de uit de kern getreden nucleoli, welke zich in pancreascellen bevinden, aan te toonen. Klieren van verschillende dieren afkomstig (hond, konijn, rat, muis, kikvorsch) werden gefixeerd in verschillende vloeistoffen (sublimaat, vloeistof van ZENKER, vloeistof van KOPSCH). Behalve de nuclealreactie werden histologische kleurmethoden toegepast (kleuringen met haematoxyline en eosine, ijzerhaematoxyline volgens HEIDENHAIN, kleurmengsel van BIONDI, lichtgroen en safranine). Nòch met de eerste, nòch met de tweede methode kon een uittreden van nucleoli uit de kern worden waargenomen. Het voorkomen dezer lichaampjes buiten de kern werd slechts in cellen van den worteltop van hyacinthen gezien. Terwijl sommigen van deze na behandeling volgens FEULGEN en ROSSENBECK ongekleurd bleven, meende ik aan anderen een zwak-violette tint te kunnen waarnemen. Er zij hiermee niet gezegd, dat het uittreden gedurende het leven zou hebben plaats gehad; veel meer moet hier aan een mechanisch effect van het microtoommes worden gedacht.

Voor verdere bijzonderheden omtrent de nucleoli zij naar bl. 45 e.v. verwezen.

Over het uittreden van nucleoli uit de kern van verhoornde cellen, zooals door KOLLMAN en PAPIN beschreven is, zal nog in hoofdstuk V sprake zijn.

HOOFDSTUK V.

In cellen voorkomende structuren, van welke een herkomst uit de kern niet vast staat.

In dit hoofdstuk zullen achtereenvolgens worden besproken verschillende structuren, waarover de meeningen omtrent een herkomst uit de celkern of uit het celplasma nog zeer verdeeld zijn.

A. Het chromidiaalapparaat van Goldschmidt.

De naam „chromidiën" is afkomstig van RICHARD HERTWIG, die in 1902 meedeelde, dat hij in het cytoplasma van de eencellige *Actinosphaerium Eichhornii* kleine korreltjes had waargenomen, welke zich op dezelfde wijze kleurden als het chromatine van de kern. Zelfs waren ze afkomstig van de kern, hetgeen er toe leidde deze korrels als chromidiën aan te duiden. Een zeker bewijs voor deze opvatting, dat zij inderdaad uit de kern afkomstig waren en uit chromatine bestonden, zou zijn, dat bij uitgehongerde dieren de geheele kern zich in dergelijke korrels had opgelost. Terwijl HERTWIG eerst van meening was, dat zoo'n cel met uiteengevallen kern zich weer kon herstellen door uit de korrels een nieuwe kern op te bouwen (z.g. physiologische degeneratie), moest hij later de onjuistheid hiervan toegeven. Onder normale omstandigheden evenwel zouden chromidiën uit de intact blijvende kern treden en zich in het protoplasma ophoopen.

Deze mededeelingen van HERTWIG zijn van groote beteekenis geworden door de groote reeks onderzoekingen en publicaties, welke in de daarop volgende jaren van de hand van GOLDSCHMIDT (1904 e.v.) verschenen zijn. Deze onderzoekingen betreffen vooral de weefsels van *Ascaris lumbricoides* en *Ascaris megalocephala*.

In spiercellen, in epitheelcellen van den darm en in kliercellen vond hij structuren, die zich sterk met kernkleurstoffen kleurden en overeen zouden komen met de door HERTWIG bij protozoën beschreven chromidiën. Deze chromidiën doen zich in de spiercellen van den oesophagus voor als staafjes van verschillende lengte en dikte, die soms gestrekt, soms sterk gekronkeld verloopen. Die strengen zijn vooral rondom de kern in groot aantal te vinden; niet onmiddellijk tegen de kern aanliggend, omdat meestal om de kern een perinucleaire protoplasmazône aanwezig is, waaraan een concentrisch lamellaire bouw is waar te nemen. Het aantal chromidiën is in de verschillende cellen verschillend, afhangend van den functioneelen toestand, waarin de cel verkeert. Zoo nam in spiercellen van ascaris het aantal chromidiaalstrengen bij tetanisch werkende prikkels, tot op een bepaalde hoogte, sterk in aantal toe; werden de spieren echter te langdurig geprikkeld, dan verminderde het aantal chromidiën om ten slotte geheel te verdwijnen. Ook in de darmepitheelcellen komen de chromidiën onder deze en andere vormen voor.

GOLDSCHMIDT (1904, 1909) heeft zich in zijn beschouwingen niet alleen tot de weefsels van ascariden bepaald, doch strekte ze ook uit over weefsels van alle andere dieren. Allerlei tot nu toe in de cel beschreven structuren (de mitochondriën van MEVES en BENDA; de basaalzoom in verschillende kliercellen, het z.g. ergastoplasma van PRENANT; de dooierkern; de nevenkern; het apparato reticolare interno van GOLGI; enz.) zouden niets anders zijn dan uit de kern getreden chromidiën, die in het protoplasma der cel verschillende gedaanten kunnen aannemen. In elke dierlijke cel zouden daarmee a.h.w. twee soorten chromatine voorkomen; chromatine, dat beperkt blijft tot de eigenlijke celkern, ook de, het individu eigen, overerfelijke eigenschappen bevat, en *idiochromatine* genoemd wordt; en chromatine, dat zoowel in de celkern als in het protoplasma (hier in den vorm van chromidiën) kan voorkomen, een rol speelt bij de celstofwisseling, en daarom *trophochromatine* heet.

Door GOLDSCHMIDT en andere onderzoekers is in een groot aantal publicaties getracht het bestaansrecht van dit uit de kern afkomstige chromidiaalapparaat aan te toonen. Vooral hebben zij zich moeite gegeven het uittreden der chromidiën uit de kern

in het protoplasma in microscopische praeparaten waar te nemen. Zoo werden door POPOFF (1907) de veranderingen nagegaan, welke gedurende de rijpwording in eicellen van *Paludina vivipara* en *Helix pomatia* plaats hebben. In de oögoniën treden in het sponsachtig gebouwd protoplasma kleine korreltjes en staafjes in de onmiddellijke nabijheid der kernmembraan op, welke zich precies op dezelfde wijze als de kern met ijzerhaematoxyline kleuren. Deze korrels en staafjes zouden de chromidiën moeten voorstellen. Bij de verdere ontwikkeling der eicel nam het aantal chromidiën sterk toe; met deze vermeerdering ging gepaard een verschuiving der verhouding tusschen staafjes en korrels ten gunste van de eersten. Opvallend was de nauwe betrekking, welke tusschen kernchromatine en chromidiën bestond; vooral in het stadium, waarbij de chromatinelissen aan één pool der kern opgehoopt zijn, bevinden de chromidiën zich uitsluitend op die plaats, waar de lissen de kernmembraan aanraken. Daar treden de chromidiën zoo nauw met de kernmembraan in contact, dat deze niet duidelijk meer te onderscheiden wordt; het is, alsof een vloeiende overgang tusschen chromidiën en kernchromatine bestaat. Bij de verdere toename in grootte der cel en de vorming van dooierbolletjes, trad een sterke vermeerdering van het aantal chromidiën op; deze lichaampjes verstrooiden zich dan van uit de kern over het geheele protoplasma. Dit zou er op moeten wijzen, dat tusschen chromidiën en functietoestand der cel een betrekking bestaat. Een ontstaan van dooierbolletjes uit chromidiën kon echter niet worden waargenomen. Overeenkomstige beelden, als hier zijn beschreven, werden ook aan eicellen van *Helix pomatia* gevonden.

Door PAUL BUCHNER (1909) is een uittreden van chromatine uit de kern in het protoplasma, zoowel door directen overgang als door diffusie (door „uitzweeting" zooals de schrijver dit noemt), bij spermatogoniën van *Oedipoda* in het z.g. bouquetstadium beschreven, d.i. in dat stadium, waarbij het chromatine in de kern zich reeds tot chromosomendraden heeft gerangschikt, die met hun eene uiteinde aan één kernpool samenkomen, terwijl zij van uit dat punt naar verschillende richtingen divergeeren. In dit bouquetstadium treden in het protoplasma, grenzend aan die kernpool, waar de chromosomen convergeeren,

talrijke korreltjes op, welke zich op dezelfde wijze kleuren als het chromatine. Tegelijk met het ontstaan van het bouquetstadium neemt het protoplasma, en hierin tevens de mitochondriën, aanzienlijk in hoeveelheid toe. BUCHNER meent hieruit te mogen besluiten, dat de mitochondriën identiek zijn met de chromidiën en uit het kernchromatine hun oorsprong nemen. Wat aan de zaadcellen van *Oedipoda* gezien werd, gold tevens voor de eicellen van *Gryllus*. Ook hier werden in het bouquetstadium dezelfde beelden waargenomen n.l. uittreding van chromatinemassa uit de kern en aanzienlijke vermeerdering van het aantal mitochondriën.

Zeer overtuigende figuren over het uittreden van chromatine in het protoplasma worden door JÖRGENSEN (1910) bij ovogoniën van *Proteus* afgebeeld. Het gelukte hem hier een cel te fixeeren juist op het oogenblik, dat vanaf de kernpool met de convergeerende chromosomen chromatinemassa in het protoplasma afstroomt. De als een kluwen opgerolde, in het protoplasma liggende mitochondriën zijn hier als een directe voortzetting van de bouquetlissen der kern te zien.

Soortgelijke waarnemingen als hierboven genoemd zijn, verrichtte SCHAXEL (1910) aan eicellen van *Ascidiën*. In de eerste stadia van den groei bevat het protoplasma der oöcyten nog geen structuren; het bevindt zich volgens SCHAXEL in het z.g. stadium der primaire achromasie. Na het bouquetstadium, als het chromatine in de kern weer tot een fijn netwerk geworden is, treden aan de oppervlakte der kern kleine korreltjes op, die zich op dezelfde wijze als het chromatine kleuren en door den schrijver voor chromidiën worden gehouden. Zij gaan zich n.l. spoedig in het celplasma verspreiden, waar ze bij sommige soorten (*Ascidia*) tot draadjes worden (tot z.g. pseudochromosomen), bij andere (*Cionia*) een compacte massa vormen. Het celplasma is nu in het stadium der chromasie getreden. Met het ontstaan der dooierbolletjes verdwijnen nu ook deze basophiele bestanddeelen van het protoplasma, die bij de genese der eersten waarschijnlijk een rol spelen; het celplasma bevindt zich dan in het stadium der secundaire of vitelline achromasie. Dezelfde beelden nam SCHAXEL ook waar aan eicellen van *Pelagra noctiluca*. Een deel der chromidiën doet hier mee aan de vorming der dooierkorrels,

terwijl de rest tusschen deze korrels blijft bestaan en overeenkomt met wat andere onderzoekers voor mitochondriën houden.

Naast dit uittreden van chromatine uit de kern bij geslachtscellen, zijn ook bij andere cellen beelden waargenomen, die voor de opvatting van GOLDSCHMIDT pleiten. Zoo beschrijven SCOTT (1899) en HOLMGREN (1906) ditzelfde proces bij ganglicellen; ISSAKOWITSCH (1910) bij kliercellen; SZILY (1911) bij het ontstaan der pigmentkorrels in het buitenblad der retina. Volgens MOROFF (1909) zouden bij *Copepoden* de spierfibrillen uit het chromatine der celkern gevormd worden; dit proces gaat zoover tot bij de volwassen dieren alle chromatine verbruikt is, zoodat de spiervezels geen kernen meer bevatten. Bij onderzoekingen over het facettenoog van *Crustaceeën* vond MOROFF, dat pigmentkorrels uit chromatinedeeltjes van gedegenereerde kernen gevormd werden.

Het is begrijpelijk, dat op deze opvattingen, welke het chromidiaalapparaat identificeeren met andere structuren in de cel, in het bijzonder met mitochondriën, en hun afkomst uit de kern bepleiten, van verschillende kanten een scherpe kritiek is uitgeoefend. Zoo meenen VEJDOVSKY (1907) en BILEK (1909), dat de door GOLDSCHMIDT beschreven chromidiaalstrengen bij Ascaris de sterk beschadigde draden van het normaal aanwezige draderige skelet der cellen zijn. In zorgvuldig behandelde objecten werden de beelden, zooals GOLDSCHMIDT ze beschreven heeft, tevergeefs gezocht. Wel werd in plaats daarvan in de darmcellen van *Ascaris lumbricoides* een systeem van fibrillen gevonden, die volgens de meening van VEJDOVSKY en BILEK als steunfibrillen dienst doen, van de eene pool der cel naar de andere loopen en om de kern een soort korf vormen. Werden de stukjes weefsel echter behandeld op de door GOLDSCHMIDT aangegeven wijze, dan konden allerlei overgangen worden waargenomen van beschadigde, uit hun verband gerukte, steunfibrillen tot de als chromidiaalapparaat beschreven strengen. Dergelijke beelden ontstonden vooral, als de stukjes weefsel, voordat ze in paraffine werden ingesloten, niet goed waren ontwaterd.

Wat de identiteit der chromidiën met de chondriosomen betreft, zelfs een voorstander der chromidiënleer als SCHAXEL (1911) heeft bij behandeling van ovogoniën van *Holothuria tu-*

bulosa, Asterias glacialis en *Ciona intestinalis* volgens de methoden van BENDA en ALTMANN moeten toegeven, dat de op deze wijze aantoonbare korrels en staafjes verschillend zijn van de met andere methoden aantoonbare chromidiën. Een gelijkstelling van chondriosomen met het buiten de celkern voorkomende chromatine is dan ook volgens dezen schrijver niet meer te verdedigen.

Eigen onderzoek.

1° HET EIGENLIJKE CHROMIDIAALAPPARAAT.

De bestudeering van het chromidiaalapparaat werd verricht aan objecten, welke ook door GOLDSCHMIDT in hoofdzaak hiervoor gebruikt zijn, n.l. spiercellen en darmepitheelcellen van *Ascariden*. Exemplaren van den paardenspoelworm, uit het abattoir afkomstig, werden gefixeerd in sublimaat en vloeistof van ZENKER en verder in paraffine ingesloten.

Bij kleuring met ijzerhaematoxyline volgens HEIDENHAIN werden zoowel in de spiercellen, als in de cylindercellen van het darmepitheel, behalve de aan de basis gelegen kernen, intraprotoplasmatische structuren aangetoond, welke de kleurstof sterk aangetrokken hadden en overeenstemmen met wat door GOLDSCHMIDT als chromidiaalapparaat is beschreven. Hier zij echter meegedeeld, dat de chromidiën lang niet in de cellen van alle ascariden duidelijk werden aangetroffen. Ik kreeg den indruk, dat een goede fixatie juist gepaard gaat met een minder duidelijk worden van het chromidiaalapparaat. Dieren, die, voordat ze in de fixatievloeistof werden gedompeld, eerst waren opengeknipt, waar dus het fixatief onmiddellijk met alle weefsels in aanraking kon komen zonder eerst de dikke chitinemantel te moeten doordringen, vertoonden in het geheel geen of slechts een moeilijk te herkennen chromidiaalapparaat, vergeleken bij dieren, die in hun geheel in het fixatiemiddel waren geplaatst.

Past men de nuclealreactie toe, dan ziet men dat van een chromidiaalapparaat niets is te herkennen, terwijl de celkernen zich als duidelijk violet gekleurde lichaampjes voordoen. Wel echter ziet men, dat het geheele weefsel een diffuse licht-violette kleur heeft aangenomen. De mogelijkheid zou kunnen bestaan, dat onder invloed der hydrolyse een diffusie van het nucleïnezuur

uit het chromidiaalapparaat over het geheele praeparaat heen heeft plaats gehad. Wijziging der hydrolysetijden en hydrolysetemperaturen had echter steeds hetzelfde resultaat ten gevolge, zonder dat van een chromidiaalapparaat of van afzonderlijk liggende chromidiën ooit iets te bespeuren viel. Laat men de hydrolyse achterwege, dan ziet men ook in dit geval een lichtviolette kleur over het geheele praeparaat, terwijl de celkernen ongekleurd zijn gebleven.

Op grond van deze uitkomsten acht ik het zeer onwaarschijnlijk, dat het z.g. chromidiaalapparaat zou zijn op te vatten als een deel van de celkern, en zou bestaan uit dezelfde stoffen als waaruit de laatste is opgebouwd. De diffuse kleur, welke over het geheele praeparaat wordt waargenomen, kan niet veroorzaakt zijn door de aanwezigheid van een aan thymonucleïnezuur verwant nucleïnezuur.

Ook de meening van GOLDSCHMIDT, dat alle in het protoplasma voorkomende structuren zouden moeten worden beschouwd als een chromidiaalapparaat en daarmee dus als in het celplasma voorkomende kernbestanddeelen, kon niet worden bevestigd. Van twee, algemeen in cellen voorkomende, structuren werd dit nagegaan, n.l. voor chondriosomen en voor het apparato reticolare interno van GOLGI.

2° CHONDRIOSOMEN.

Verschillende klieren (traanklier, pancreas, speekselklier) werden in de volgende fixatieven gefixeerd, waarvan bekend is, dat zij vooral chondriosomen goed fixeeren.

a. *Fixatief van* KOPSCH—REGAUD.

3% kaliumbichromaat	80 c.c.
formol	20 c.c.

Fixatie gedurende 24 uur; dan gedurende 4—5 dagen chromeeren in een oplossing van 3% kaliumbichromaat, en vervolgens gedurende 24 uur spoelen in leidingwater. Insluiten in paraffine.

b. *Fixatief van* KINGSBURY.

1° Fixeeren in vloeistof van ZENKER, doch met $^1/_2$%—hoogstens 1% azijnzuur, gedurende 2 dagen.

2° Overbrengen in vloeistof van MÜLLER; de organen blijven hierin 10—14 dagen, in de broedstoof bij 38° C.

3° Zonder in water uit te spoelen direct overbrengen in alcoholen van stijgende concentratie, waaraan wat jodium is toegevoegd tot een cognackleur is opgetreden. Insluiten in paraffine.

c. *Vloeistof van* CHURA.

Met de methode van CHURA zouden niet alleen de mitochondriën gefixeerd worden, doch zou ook de structuur van de celkern bewaard blijven. Daartoe worden kleine stukjes weefsel eerst gedurende 24 uur gefixeerd in het volgend mengsel, dat steeds opnieuw dient te worden klaargemaakt:

chroomfluorideoplossing 1,5%	25 c.c.
kaliumbichromaatoplossing 7,5%	25 c.c.
verzadigde pikrinezuuroplossing	5 c.c.
formol	20 c.c.

Vervolgens wordt in het volgend mengsel gedurende 3 dagen nagechromeerd:

chroomfluorideoplossing 1,5%	
chroomaluinoplossing 1,5%	
kaliumbichromaatoplossing 7,5%	aaa

Na chromeering wordt gedurende 24 uur in stroomend water gespoeld; van belang is het de stukjes weefsel gedurende het eerste uur in een spoelflesch in niet stroomend water te brengen, waaraan 2 à 3 gr. lithiumcarbonaat is toegevoegd. Via alcoholen van stijgende concentratie insluiten in paraffine.

Terwijl in al deze gevallen met ijzerhaematoxyline of met zuurfuchsine na kleuring volgens de methode van ALTMANN—KULL duidelijk het voorkomen van chondriosomen in de cellen is waar te nemen, blijken na toepassing der nuclealreactie zich alleen de kernen gekleurd te hebben; het protoplasma is geheel kleurloos gebleven. Deze resultaten pleiten dus niet voor een bouw uit kernsubstanties der chondriosomen.

3° APPARATO RETICOLARE INTERNO VAN GOLGI.

Ter aantooning van dit netapparaat werd gebruik gemaakt van *de uraannitraatmethode van* RAMON Y CAJAL:

Kleine stukjes weefsel (traanklier) worden gedurende 10—14 uur in het volgende mengsel gefixeerd:

formol	15 c.c.
aq. dest.	85 c.c.
uraannitraat	1 gr.

Na een korte spoeling in aq. dest. (slechts enkele seconden) komen ze gedurende 36—48 uur in een 1% oplossing van $AgNO_3$. Vervolgens na een kortdurende spoeling in water gedurende 8—24 uur in de volgende reductievloeistof:

hydrochinon	1,5 gr.
formol	15 c.c.
aq. dest.	100 c.c.
watervrij natriumsulfiet	0,5 gr.

Na spoeling in water worden de organen tot paraffinecoupes verwerkt. Het resultaat is, dat het binnennet zwart, terwijl de rest van het weefsel lichtgeel gekleurd is.

Duidelijkere beelden worden verkregen, indien na de behandeling volgens RAMON Y CAJAL de coupes aan de inwerking van de goudchlorideoplossing volgens BJÖRKENHEIM worden blootgesteld. Hiertoe komen de coupes na verwijdering der paraffine en spoeling in aq. dest. gedurende 20—30 min. (d.i. tot dat de praeparaten een grauwviolette tint vertoonen) in het volgende bad, bestaande uit gelijke deelen der mengsels A en B.:

Mengsel A

natriumhyposulfiet	30 gr.
ammoniumrhodanaat	30 gr.
aq. dest.	1000 c.c.

Mengsel B.

goudchloride	1 gr.
aq. dest.	100 c.c.

Dan wordt zorgvuldig in water gespoeld en gedurende 5—10 minuten in de *oplossing van* VERATTI gebleekt, bestaande uit:

kaliumpermanganaat	0,5 gr.
zwavelzuur	1 c.c.
aq. dest.	1000 c.c.

Vervolgens gedurende korten tijd in een oplossing van 1% oxaalzuur gespoeld en goed in water uitgewasschen. Insluiten in canadabalsem. Een nakleuring met aluinkarmijn, zooals wordt aanbevolen, werd niet toegepast. Het GOLGI-apparaat verschijnt

na deze behandeling als een zwart netwerk op violetten achtergrond.

Werden nu deze praeparaten gehydrolyseerd en aan de inwerking van het zwaveligzure fuchsine blootgesteld, dan bleek nergens in het netapparaat een violette kleur te kunnen worden waargenomen. Nòch hydrolyse, nòch het zwaveligzure fuchsine hadden eenigen invloed op het beeld der met de uraannitraatmethode, of volgens BJÖRKENHEIM behandelde praeparaten.

De mogelijkheid zou kunnen bestaan, dat door de zwarte neergeslagen zilvermassa de violette kleur van het positief reageerende GOLGI-net bedekt zou worden. Immers aan de bruingetinte kernen was ook niet zonder moeite de paarse kleur te herkennen. Daarom werden sommige praeparaten in een oplossing van salpeterzuur gedompeld, tot alle zilverneerslag verdwenen was; daarna werd dan de nuclealreactie toegepast. Ook in deze gevallen echter, waar dus de zilverneerslagen uit de praeparaten verdwenen zijn, kon geen positieve reactie buiten de kern worden waargenomen.

Het blijkt dus, dat het chromidiaalapparaat, zooals dit in cellen van *Ascaris* door GOLDSCHMIDT beschreven is, geen positieve nuclealreactie vertoont; ook de chondriosomen, evenals het netwerk van GOLGI, welke volgens GOLDSCHMIDT als chromidiën moeten worden beschouwd, kleuren het zwaveligzure fuchsine na hydrolyse niet.

B. De dooierkern in eicellen.

In eicellen van verschillende dieren komt naast de celkern een lichaam voor, dat bekend staat onder den naam van dooierkern, omdat zich rondom deze structuur de dooiermassa zou vormen. Vooral bij insecten, in het bijzonder bij de spin (*Tegeneria*), waar zij het eerst in 1845 door WITTICH is ontdekt, is deze dooierkern door BALBIANI (1864 e.v.), VAN DER STRICHT (1898), HENNEGUY (1887) aan een nauwkeurig onderzoek onderworpen. VAN DER STRICHT onderscheidt drie stadia in de ontwikkeling van dit lichaam. In het eerste stadium vormt zich in jonge eicellen een dunne laag van een fijnkorrelige massa, welke

de kern als een mantel omgeeft en daarom mantellaag wordt genoemd. In het tweede stadium gaat zich nu daar, waar zich het dikste gedeelte der laag bevindt, een blaasje vormen, waarin na safraninekleuringen dikwijls een of twee korrels (de centriolen) zichtbaar zijn; dit blaasje is volgens BALBIANI de eigenlijke dooierkern, en wordt naar hem meestal de *dooierkern van* BALBIANI genoemd, terwijl het overige gedeelte onder den naam van *dooierlichaam* bekend staat. Om deze kern van BALBIANI gaat zich de dooiermassa nu laagsgewijze afzetten. In het derde stadium valt de mantellaag in stukken uiteen, zoodat alleen de dooierkern nog behouden blijft.

Door verschillende andere onderzoekers werd de dooierkern in eicellen van vele andere dieren aangetroffen; zoo door NEMEC (1897) bij *Polyzonium germanicum* en *Blaniulus guttulatus*, door CRAMPTON bij *Ascidiën* (*Molgula manhattensis*), door FAURÉ-FREMIET (1910) bij *Julus terrestris*. Niet alleen bij deze lagere dieren, ook bij de vertebraten is door verschillende onderzoekers de aanwezigheid der dooierkern vastgesteld. O.a. door VAN BAMBEKE (1873) en HENNEGUY in de eicellen van een aantal visschen; door JÖRGENSEN bij *Proteus*, door LAMS (1906, 1907) bij den kikvorsch, door GURWITSCH (1900) bij zoogdieren, terwijl VAN DER STRICHT (1898) aan eicellen van den mensch eveneens de drie ontwikkelingsstadia der dooierkern, zooals die bij de spin voorkomen, kon vaststellen.

Evenals dit het geval is geweest met de nevenkern der zaadcellen, zoo zijn ook als dooierkern door verschillende onderzoekers dikwijls verschillende structuren beschreven. De onderzoekers zijn het echter meestal in dit opzicht met elkaar eens, dat de dooierkern der eicellen homoloog is met de nevenkern der zaadcellen. Alleen over de ontstaanswijze er van, zooals trouwens ook bij de nevenkern het geval is, loopen de meeningen uiteen. Zoo schrijft BALBIANI, dat deze dooierkern niets anders is dan het centrosoma der cel. Ook GURWITSCH is tot deze opvatting gekomen bij zijn onderzoekingen aan ovariën van jonge caviae; in de ovocyten dezer dieren bestond de dooierkern uit een ophooping van een, van het overige cytoplasma scherp afgescheiden, protoplasmamassa, waarin zich de centriolen bevonden. NEMEC (1897) heeft aan eicellen van *Polyzonium ger-*

manicum het ontstaan der dooierkern kunnen vervolgen. In de jongste stadia der eiontwikkeling werd een enkel dicht bij de kern gelegen lichaampje gevonden; bij een wat verder voortgeschreden ontwikkeling waren twee van zulke, dicht bij elkaar en bij de kern gelegen, lichaampjes aan te toonen. Eén der lichaampjes plat zich nu af, groeit sterk en gaat de kern als een kap omgeven; soms omhult het de kern zelfs geheel. Het andere lichaampje verandert niet van vorm; het gaat zich naar de kernpool tegenovergesteld aan die, waar zich de kap bevindt, bewegen, ofschoon het ook op een andere plaats, dicht bij de kap, zelfs onder de kap kan voorkomen. In een volgend stadium ontstaan in de kap groote vacuolen, die haar in verschillende stukken uiteen doen vallen; aan dien kant der kap, welke tegen de kern aan gelegen heeft, ontstaan de dooierbolletjes. Het tweede lichaampje wordt in de latere stadia der eirijping hoe langer hoe onduidelijker en is ten slotte, zelfs bij gebruik van verschillende kleurmethoden, niet meer aantoonbaar. Nemec meent uit deze beelden te kunnen opmaken, dat de genoemde structuur, welke zich als een kap tegen de kern aanlegt, overeenkomt met de dooierkern van Balbiani, en zich ontwikkelt uit het centrosoma. Wel is een deeling van het oorspronkelijk enkelvoudig lichaampje (het centrosoma) niet waargenomen, maar toch meent hij als vaststaand te mogen beschouwen, dat deze deeling heeft plaats gevonden, waarbij dan de eene helft centrosoom blijft, de andere tot dooierkern wordt.

Henneguy, Fauré—Fremiet, e.a. meenen echter te hebben kunnen opmerken, dat de korrelige massa, waaruit de tegen de celkern aanliggende kap is opgebouwd, bestaat uit mitochondriën. Henneguy kon met behulp van het dahliaviolet de mitochondriën (welke deze kleurstof aantrekken) scherp onderscheiden van het centrosoma met de zich daaromheen bevindende astrosphaer (die ongekleurd blijven). Het dooierlichaam in eicellen van caviae bleek, volgens deze methode behandeld, te zijn opgebouwd uit mitochondriën.

Fauré—Fremiet vond in eicellen van *Julus terrestris*, dat de mitochondriën zich bij sommige exemplaren tot een, de kern omgevende, korrelige laag hadden ontwikkeld, terwijl zij bij anderen verspreid of in korte rijen gerangschikt in het protoplasma

voorkwamen. Ook in eicellen van *Tegeneria* kon FAURÉ—FREMIET vaststellen, hoe zich de om de kern liggende kap uit mitochondriën vormde. Deze kap breidde zich verder uit tot het dooierlichaam, terwijl hierin zich dan door een opzwelling de eigenlijke dooierkern van BALBIANI vormde. Hoewel het dezen onderzoeker niet gelukt is in de dooierkern centriolen aan te toonen, acht hij het niet onmogelijk, dat deze hier toch in kunnen voorkomen.

Door LAMS (1906, 1907) is de ontwikkeling der dooierkern aan eicellen van den kikvorsch (*Rana fusca*) bestudeerd. Volgens deze onderzoekingen bleek de dooierkern identiek te zijn met de astrosphaer, terwijl de mitochondriën voor de vorming van de overige dooiermassa een belangrijke rol spelen. Reeds in de jongste stadia der eicellen, in de zich deelende oögoniën, is een astrosphaer te herkennen. In de zich uit de oögoniën vormende oöcyten doet zich deze astrosphaer voor als een klein blaasje, waarin één of twee centraallichaampjes te herkennen zijn. Rondom deze eigenlijke dooierkern bevindt zich een sterk korrelige protoplasmamassa in den vorm van een halve maan; deze korrels zijn niet anders dan de mitochondriën der eicellen. In een later stadium neemt deze mitochondriënophooping den vorm van een U aan, terwijl de eigenlijke dooierkern moeilijk meer te herkennen valt.

Ook HELENE GAJEWSKA (1919) heeft de genese der dooierkern nagegaan aan eicellen van Amphibiën (Tritonen), en is tot het besluit gekomen, dat deze nòch met de astrosphaer, nòch met het centrosoma iets te maken heeft. Ook van eenig verband tusschen dooierkern en celkern was geen sprake. Bij de ontwikkeling der dooierkern lieten zich drie stadia onderscheiden: 1° een ophooping van ergastoplasmatische substantie; (Onder ergastoplasma werd hier verstaan een gedeelte van het protoplasma, dat zich door grootere dichtheid van het overige celplasma en mitochondriën onderscheidde en dikwijls den vorm van een netwerk had aangenomen. Bij mitochondriënkleuring volgens BENDA kleurde dit ergastoplasma zich violet, terwijl de mitochondriën met deze methode hemelsblauw werden). 2° een ophooping van mitochondriën, welke zich met het ergastoplasma tot één lichaam verbindt; 3° rondom dit lichaam ontstaan hoopjes van vetbolletjes en eiwitplaatjes.

Door verschillende van bovengenoemde onderzoekers is dus

vastgesteld, dat in het dooierlichaam (bestaande uit mitochondriën) in een later stadium de dooierkern (bestaande uit het centrosoma) als een bijzondere structuur zichtbaar kan worden. GOLDSCHMIDT en zijn leerlingen echter meenen, dat deze dooierstructuur is opgebouwd uit chromidiën, hetgeen dus een herkomst uit de celkern en een bestaan uit chromatine inhoudt. In een groot aantal onderzoekingen hebben zij getracht aan te toonen, dat uit de kern partikels aan het protoplasma worden afgegeven, welke zich daar tot de genoemde structuren vervormen. In de vorige rubriek over het chromidiaalapparaat werden reeds verschillende van deze onderzoekingen genoemd, t.w. die van POPOFF (1907) aan eicellen van *Paludina vivipara* en *Helix pomatia*, en die van BUCHNER (1909) aan eicellen van *Gryllus*. Volgens onderzoekingen van JÖRGENSEN (1901) op eicellen van amphibiën, is de dooierkern een gecompliceerd lichaam, dat uit niet minder dan vijf substanties van verschillende herkomst is opgebouwd, en wel uit: 1° het centrosoma; 2° de mitochondriën, welke bij de laatste celdeeling zijn overgebleven; 3° chromatine, dat in het bouquetstadium van uit de kern in het protoplasma is overgegaan; 4° vetachtige stoffen; 5° afbraakproducten afkomstig van het vet en van het uit de kern uitgestooten chromatine. Dank zij de adhaesieve kracht van het centrosoma worden deze verschillende bestanddeelen bij elkaar gehouden. SCHAXEL (1910) zag in oögoniën van *Ciona intestinalis*, hoe na het bouquetstadium, wanneer het chromatine in de kern zich weer tot een fijn netwerk had gevormd, kleine korrels aan het kernoppervlak optraden, die zich op dezelfde wijze als chromatine kleurden, en op grond daarvan voor chromidiën moeten worden gehouden. Deze chromidiën laten spoedig van de kern los, begeven zich in het protoplasma en vormen daar, tot een compacte massa vereenigd, de dooierkern.

Eigen onderzoek.

Ter onderzoek kwamen ovariën van jonge caviae, pasgeboren en jonge katten, kikvorschen en salamanders. Volgens ROMEIS (1924) zou in de ovariën van katten de dooierkern zeer duidelijk te zien zijn. De organen werden gefixeerd in sublimaat en in de vloeistof van ZENKER. Naast de nuclealreactie werden kleuringen

verricht met haematoxyline en eosine, ijzerhaematoxyline en benzopurpurine, en volgens MALLORY.

In verschillende jonge eicellen werd naast de kern een min of meer korrelige ophooping gevonden, welke zich met ijzerhaematoxyline en benzopurpurine bruin, volgens MALLORY behandeld rood tot oranje had gekleurd. Past men de nuclealreactie toe, dan ziet men, dat zich buiten de kern nergens stoffen bevinden, welke het zwaveligzure fuchsine hebben gekleurd, ook niet, indien hydrolyseduur en hydrolysetemperatuur gewijzigd worden. Nòch met histologische kleurmethoden, nòch met de nuclealreactie kon een uittreden van chromatine uit de kern in het protoplasma worden waargenomen.

De volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandelde praeparaten kunnen dus de meening, dat de dooierkern uitsluitend of gedeeltelijk uit kernsubstanties is opgebouwd, niet steunen. Zeer waarschijnlijk is, dat de mitochondriën een groot aandeel hebben in het ontstaan dezer celstructuur; dat de laatstgenoemde celbestanddeelen niet van de kern afkomstig zijn, is reeds in de vorige rubriek uiteengezet.

C. De nevenkern in zaadcellen.

Door VON LA VALETTA ST. GEORGE werd in 1867 in de spermatiden van insekten een naast de kern gelegen structuur aangetoond, waaraan hij eerst den naam van „nevenlichaam" („Nebenkörper"), later den door BÜTSCHLI ingevoerden naam van „nevenkern" („Nebenkern") gegeven heeft. De genese van dit lichaam werd vooral aan de zaadcellen van *Blatta* bestudeerd, waarbij bleek, dat het zich uit korrels, de z.g. cytomicrosomen, die reeds in het protoplasma der spermatocyten aanwezig waren, zou vormen.

Door verschillende andere onderzoekers zijn in de cellen der testes en in die van andere weefsels structuren gevonden, die zouden overeenkomen met de nevenkern in de spermatiden van *Blatta*. KORSCHELT, (1895), WALDEYER (1887), BENDA (1897), MEVES (1900) meenen evenwel, dat verschillende andere celbestanddeelen, die met de nevenkern van VON LA VALETTA ST. GEORGE niets te maken hebben, hiermee geïdentificeerd zijn geworden, waardoor ook begrijpelijk wordt, dat de verklaringen

omtrent de genese van dit lichaam zoo uiteenloopen. Zoo beschreef OGATA (1883) in de pankreascellen bij den mensch een nevenkern, die door uitstooting van den nucleolus uit de kern zou zijn ontstaan. Hetzelfde werd door GALEOTTI (1893) bij de pancreascellen van *Spelerpes* waargenomen. Ook WEISMANN en ISCHIKAWA (1889) hebben in de eicellen van *Leptodora* gezien, hoe de nucleolus werd uitgestooten en tot nevenkern veranderde.

Naast dit voorkomen van z.g. nevenkernen in andere cellen dan zaadcellen, werden ook in deze laatste door verschillende onderzoekers verschillende structuren als nevenkern beschouwd. Zoo beschreef PLATNER (1889) in de spermatogoniën en spermatocyten van mollusken en zoogdieren het voorkomen van een nevenkern waarvan echter latere onderzoekingen van MURRAY (1898) uitmaakten, dat hier het door zijn grootte opvallende centrosoma (het idiosoma van MEVES) was beschreven. Ook andere onderzoekers hebben dezelfde fout begaan; zoo HERMANN (1897), LECLERQ (1890) en MEVES (1900) bij spermatogoniën en spermatocyten van amphibiën, RENSON (1882) en HERMANN bij die van zoogdieren. Niet alleen bij de eerste stadia der spermiogenese, ook bij de spermatiden is dikwijls het idiosoma voor de bij de insecten beschreven nevenkern gehouden. In de eerste plaats heeft VON LA VALETTA ST. GEORGE zich zelf hieraan schuldig gemaakt door het idiosoma der spermatiden van de cavia te homologiseeren met de nevenkern in de spermatiden van insecten. Daarna is dezelfde fout door andere onderzoekers begaan, door HERMANN bij amphibia, door RENSON, VON WIEDERSPERG (1885), KOLLOSOW (1888), bij zoogdieren.

MEVES, DUESBERG, FAURÉ—FREMIET meenden uit hun praeparaten te kunnen opmaken, dat deze nevenkern niets anders is dan een groep chondriosomen, die zich om het idiosoom hebben gerangschikt. Door MEVES werden onderzoekingen verricht op de zaadcellen van *Paludina vivipara* en *Pygraea bucephala*; in de verschillende ontwikkelingsstadia dezer zaadcellen konden in éénzelfde cel naast elkaar: idiosoma, de rest van het spoellichaam, en chondriosomen, welke in spermatogoniën in den vorm van afzonderlijke korreltjes, in de spermatiden samengebald tot de nevenkern voorkomen, waargenomen worden. Hiermee was de onjuistheid van de meening van BOLLES—LEE

aangetoond, volgens wien de nevenkern uit de rest van het spoellichaam zou ontstaan. De samenklontering der afzonderlijke mitochondriën tot nevenkern zou in de spermatiden geschieden, doordat deze celbestanddeelen zich aan de caudale kernpool rondom het centraallichaam ophoopen, en daar veranderen tot een achttal ringen, welke spoedig tot blaasjes worden. Deze blaasjes nemen in grootte toe ten koste van het aantal, dat tot de helft gereduceerd wordt, om ten slotte bij de volwassen spermatozoën het centrosoma, dat de as van het middelstuk vormt, als een vierdeelig hulsel te omvatten. De onderzoekingen van MEVES komen dus hierop neer, dat bij spermatogoniën en spermatocyten nog geen nevenkern aanwezig is, aangezien de mitochondriën hier nog verspreid in het protoplasma voorkomen, en dat in de spermatide de nevenkern ontstaat uit de samenballing dezer protoplasmadeeltjes. Om deze redenen stelt hij dan ook voor den naam „nevenkern", die slechts tot verwarring aanleiding kan geven, te vervangen door „mitochondriënlichaam" („Mitochondrienkörper").

Ook FAURÉ—FREMIET (1910) kwam na uitvoerige onderzoekingen op zaadcellen van insecten (vooral van *Pyrrhocoris apterus*) en slakken tot de meening van MEVES, dat de nevenkern ontstaan is uit mitochondriën.

Door een groote reeks proefnemingen tracht GATENBY (1917) te bewijzen, dat de elementen, waaruit de nevenkern der zaadcellen is opgebouwd, dezelfde zijn als de elementen, waaruit het apparato reticolare interno van GOLGI bestaat, n.l. uit de z.g. dictiosomen van PERRONCITO, en dat dus de nevenkern der zaadcellen homoloog is met het GOLGI-net en met de mitochondriën niets uit te staan heeft. Wel is waar komen mitochondriën en dictiosomen in chemisch opzicht met elkaar overeen, hetgeen zich dan ook in eenzelfde gedrag tegenover verschillende fixatieven en kleurstoffen (zoo b.v. ijzerhaematoxyline en fuchsine) uit, toch zijn er evenwel reacties, waarmee beiden van elkaar te onderscheiden zijn. Zoo zouden de dictiosomen het osmiumzuur sneller reduceeren, en bij aanwending van bepaalde zilvermethoden een zwarte kleur aannemen, terwijl mitochondriën zich onder deze laatste behandeling slechts geel kleuren.

Nog eerst enkele maanden geleden heeft GATENBY een aan-

hangster gevonden in LYDIA KARPOVA (1925). Ook zij meent, dat in de zaadcellen van de wijngaardslak de nevenkern identiek zou zijn met het apparato reticolare interno van GOLGI; zij het ook, dat dictiosomen en mitochondriën histochemisch zoo nauw aan elkaar verwant zijn, dat een hypothese, als zouden beide structuren uit éénzelfde andere stammen, niet al te misplaatst mag worden geacht.

Tegenover deze meeningen, welke dus aan de nevenkern een protoplasmatische herkomst toekennen, staan de opvattingen van de Münchener school van R. HERTWIG en GOLDSCHMIDT, welke een genese uit de celkern meenen te moeten voorstaan. Van de onderzoekingen, welke verricht zijn om deze meening te staven, mogen vooral die van WASSILIEFF en POPOFF genoemd worden. In groote trekken zijn de uitkomsten van WASSILIEFF gelijk aan die van MEVES, d.w.z. ook eerstgenoemde onderzoeker zag een ontstaan der nevenkern uit mitochondriën. Terwijl MEVES, vooral op grond van onderzoekingen van BENDA, aanneemt, dat mitochondriën een protoplasmatisch bestanddeel zijn, ontstaan uit protoplasma, meent WASSILIEFF, als leerling van R. HERTWIG en GOLDSCHMIDT, dat mitochondriën hun ontstaan aan de kern te danken hebben, dat zij het morphologisch substraat zijn van GOLDSCHMIDT's trophochromatine. POPOFF ziet in de nevenkern der zaadcellen van *Helix pomatia* niet een op zichzelf staande structuur, doch slechts een ontwikkelingsphase, welke de chromidiën bij hun verandering van uit de kern gestooten deeltjes tot mitochondriën doorloopen.

Eigen onderzoek.

Onderzocht werden testes van honden, konijnen, ratten, muizen, kikvorschen en salamanders, welke in sublimaat, de vloeistof van ZENKER of het fixatief van KINGSBURY waren gefixeerd. Gekleurd werd met haematoxyline en eosine, ijzerhaematoxyline, volgens MALLORY, volgens KOPSCH en volgens FEULGEN en ROSSENBECK.

Terwijl men in de op histologische wijze behandelde praeparaten naast de spermatidenkern veelal een compact lichaam vindt, (hetwelk, naar ik een enkele maal zag, ook naast de spermatocytenkern kan worden aangetroffen), dat in die organen,

welke gefixeerd zijn in de vloeistof van KINGSBURY en gekleurd worden volgens de methode van KOPSCH, als een rood lichaam is te herkennen, gelukt het nooit dit lichaam met de nuclealreactie aan te toonen. Evenmin kon een uitstooten van chromatinedeeltjes uit de kern worden vastgesteld.

Ook hier pleiten dus de resultaten met de nuclealreactie verkregen, sterk tegen de meening van GOLDSCHMIDT e.a.

D. **Structuren in het protoplasma van sommige eicellen.**

Door Mej. Dr. VAN HERWERDEN (1913) werden in het sponsachtig gebouwd protoplasma der eicellen van *Strongylocentrotus* (en van andere echiniden en holothuriërs) kleine basophiele korrels gevonden, die in de wanden van het protoplasmatische netwerk gelegen waren. Werden ongefixeerde, of in alcohol of kokend water gefixeerde stukjes ovarium aan de inwerking van nuclease bij 38° C. gedurende 24 uur blootgesteld, dan bleken deze korrels verdwenen te zijn. Hieruit meent de schrijfster te mogen opmaken, dat deze basophiele korrels uit een nucleïnezuurverbinding bestaan, hetgeen vóór haar nog nooit op overtuigende wijze was aangetoond.

JÖRGENSEN (1913) vond in het protoplasma der eicellen van verschillende *Patella*-soorten basophiele substanties. Haar onoplosbaarheid na inwerking van pepsine maakt het volgens den onderzoeker zeer waarschijnlijk, dat deze basophilie van het celplasma op de aanwezigheid van nucleïnezuur daar ter plaatse berust.

Eigen onderzoek.

Door tusschenkomst van het zoölogisch station te Napels, ben ik in de gelegenheid geweest de nuclealreactie op de eicellen van *Strongylocentrotus lividus* en *Patella coerulea* toe te passen. Van *Patella* werden de exemplaren in hun geheel, van *Strongylocentrotus* alleen de ovariën te Napels in een verzadigde waterige sublimaatoplossing gefixeerd en in 70 % alcohol naar Amsterdam verzonden. Hier werden ze in alcoholoplossingen van stijgende concentratie overgevoerd (de ovariën van *Patella* werden eerst uitgepraepareerd) en ten slotte in paraffine ingesloten.

Bij het microscopisch onderzoek der praeparaten, welke met gewone histologische kleurmethoden zijn gekleurd, valt de sterke

basophilie van het protoplasma en het relatief geringe gehalte aan chromatine van de celkern duidelijk in het oog. Wordt de nuclealreactie toegepast, dan ziet men, hoe overal in het protoplasma zich meer of minder duidelijk licht-violet gekleurde korrels bevinden, waartusschen de dooierbolletjes zijn opgehoopt. Blootstelling aan de inwerking van het zwaveligzure fuchsine zonder voorafgaande hydrolyse heeft geen violetkleuring, nòch van de kern, nòch van de basophiele protoplasmakorrels ten gevolge. Een samenklontering der granula tot een lichaam, dat op een dooierkern zou kunnen gelijken, werd niet waargenomen.

Evenmin kon omtrent de genese der korrels iets worden waargenomen. Men zou geneigd zijn aan te nemen, op grond van het lage gehalte aan nucleoproteïden in de kern (welke zoowel met histologische kleurstoffen als met de reactie van FEULGEN en ROSSENBECK is aan te toonen), dat nucleïnezuurhoudende bestanddeelen van uit de kern in het protoplasma zijn overgegaan. Een afstooting van chromatine uit de celkern kon echter niet worden waargenomen; evenmin een sterkere kleuring van een zône rondom de kern, welke op een uittreding van de nucleïnezuurhoudende stoffen door diffusie zou kunnen wijzen.

De positieve reactie, welke men met de nuclealmethode verkrijgt bij behandeling op de door FEULGEN en ROSSENBECK aangegeven wijze, het wegblijven der violette kleuring bij achterwege laten der hydrolyse en de uitkomsten der verteringsproeven van Mej. VAN HERWERDEN en JÖRGENSEN veroorloven dus de basophiele bestanddeelen van het protoplasma van genoemde eicellen als nucleïnezuurhoudend te beschouwen.

E. Protoplasmastructuren welke bij de verhoorning optreden.

Sedert de fundamenteele onderzoekingen van RANVIER (1879 e.v.) over de histologie der huid en de processen, welke zich bij de verhoorning afspelen, zijn door vele anderen talrijke proeven verricht, waardoor de uitkomsten van den Franschen histoloog bevestigd en hun aantal uitgebreid werden. Terwijl RANVIER aangaf, dat de inter- en intracellulair gelegen fibrillen van het stratum spinosum (welke later door HEIDENHAIN (1907) overeen-

komstig hun functie „tonofibrillen" werden genoemd) bij het verhoorningsproces in het stratum granulosum voor het grootste gedeelte verdwenen; dat daarvoor in de plaats in de cellen van deze laag talrijke eleïdinekorrels (die in 1869 het eerst door AUFHAMMER waren waargenomen) optraden, welke een bijzondere affiniteit tot kernkleurstoffen vertoonden; dat deze korrels in het stratum lucidum met elkaar vervloeiden en tot diffuus eleïdine werden (door toevoeging eener 10 % keukenzout-oplossing was de diffuse vorm weer in de granulaire over te voeren); terwijl het stratum corneum uit cellen bestond, die een uit keratine bestaande celmembraan met vettig gedegenereerde inhoud bezaten; zoo liet hij zich over het fijnere mechanisme van dit proces niet uit. Daarentegen hebben na hem komende onderzoekers gepoogd een verklaring te geven van de veranderingen, die zich bij de verhoorning afspelen en vooral van het ontstaan der eleïdinekorrels.

Wat hun resistentie tegenover chemische invloeden aangaat, zoo zijn deze korrels onoplosbaar in water, alcohol of aether, oplosbaar daarentegen in zuren en loogen. Het substraat, waaruit ze zijn opgebouwd, bevat dus eigenschappen, welke aan den eenen kant aan keratine, aan den anderen kant aan hyaline herinneren, wat voor WALDEYER (1882) aanleiding is geweest om deze korrels keratohyalinekorrels te noemen. Of de substantie van het stratum lucidum chemisch identiek is met die van het stratum granulosum en slechts de uitdrukking is van een anderen aggregaatstoestand van eenzelfde stof, zooals RANVIER meent , is sterk aan twijfel onderhevig. In elk geval is het beter voorloopig aan beide substanties niet eenzelfden naam te geven, en met JESIONEK (1916) te spreken van de keratohyalinekorrels van het stratum granulosum en het eleïdine van het stratum lucidum.

Door KROMAYER (1892) is het verdwijnen der protoplasmafibrillen en het ontstaan der keratohyalinekorrels met elkaar in verband gebracht, en hij meent dan ook, dat deze korrels uit de fibrillen zijn ontstaan. Tegen deze opvatting hebben zich UNNA (1895 e.v.), ERNST (1896) en RABL (1896) verzet, die konden aantoonen, dat de tonofibrillen in het stratum granulosum niet te gronde gaan, doch naast de granula blijven voortbestaan. Later heeft ook KROMAYER deze uitkomst moeten toegeven, behalve voor de huid van de volaire vlakte van de hand en de planta pedis.

Doch ook voor deze huidgebieden hebben RABL en WEIDENREICH (1900) de aanwezigheid der epidermisvezels kunnen vaststellen.

Tegenover deze theorie, die een protoplasmatische herkomst der korrels aanneemt, staat die van WEIDENREICH en APOLANT (1901), die de korrels eveneens uit protoplasma laten ontstaan en wel van de interfibrillaire massa, en die van SCHRIDDE (1905), welke als een combinatie van de beide vorige theorieën is op te vatten, omdat zij een genese der granula zoowel uit fibrillen als interfibrillaire substantie aanneemt.

Naast deze theorieën van hen, die zich de korrels uit het celplasma denken te zijn ontstaan, bestaan andere, welke een karyogene herkomst aannemen, hetzij dat de granula uitsluitend van de kern afkomstig zijn, hetzij dat zij de uitdrukking vormen van een menging van kern- en protoplasmabestanddeelen. Bij de verhoorning treedt n.l. een voortschrijdende degeneratie der kern op en het behoeft geen verwondering te wekken, dat door verschillende onderzoekers een deelname der kern aan de vorming van de hoornmassa en de voorstadia hiervan wordt aangenomen. Door RABL (1896) worden de veranderingen aan de kern bij verhoorning als volgt beschreven: Het begin der degeneratie is daaraan te herkennen, dat de kern smaller wordt, terwijl haar lengteafmeting dezelfde blijft. Het chromatine valt nu in kleine korrels uiteen, die in groepjes vereenigd zijn en gedeeltelijk in de kern zelf, gedeeltelijk tegen de kernmembraan aan komen te liggen. Dit degeneratieproces gaat hoe langer hoe verder; de kern wordt doorzichtiger: de achromatische verbindingsdraadjes der chromatinekorrels, die in den aanvang nog goed te zien waren, worden onduidelijk; de chromatinekorrels nemen daarbij gelijktijdig in volumen af. Nu volgt een verandering in den aggregaatstoestand der korrels; de contouren er van verflauwen en de kern verandert nu tot een homogene massa, die, wat betreft haar kleurbaarheid, nog als chromatine moet worden beschouwd en in elk geval uit de samensmelting der oorspronkelijk gescheiden chromatinekorrels is ontstaan. Dit stadium duurt slechts kort, want spoedig verliest het chromatine zijn affiniteit tot kernkleurstoffen om zich met het eosine te gaan kleuren, waardoor wat eerst basophiele kern was, zich nu als roode strepen voordoet.

Deze degeneratie der celkernen in het stratum granulosum en in de daarbuiten liggende lagen van de epidermis werd door eenige onderzoekers, o.a. MERTSCHING (1889), POSNER (1889), SELHORST (1890) met het optreden der keratohyalinekorrels in verband gebracht, en wel zou het optreden dezer korrels met het verdwijnen der kern gelijken tred houden. Een verder bewijs voor de karyogene herkomst der granula vond MERTSCHING in het steeds intracellulaire en nooit intercelllulaire voorkomen, en in het voor het eerst optreden dezer korrels in de omgeving van de kern, waarnemingen, welke door ERNST en RABL werden bevestigd.

Tegen de eerste veronderstelling, dat het optreden der keratohyalinekorrels gelijken tred zou houden met het verdwijnen der kern, heeft zich eerst RABL en later WEIDENREICH verzet, aangezien zij vonden, dat er cellen waren, waarbij het protoplasma volgepropt was met granula, terwijl aan de kern nauwelijks een spoor van degeneratie was te herkennen. De theorie van MERTSCHING en SELLHORST, waarbij de korrels als een degeneratieproduct van de kern in haar geheel worden beschouwd, is dan ook volgens RABL niet meer houdbaar. Daar echter ook hij het eerste optreden der granula rondom de kern zag, doch verder geen bepaalde verhouding tusschen kleurbare kernbestanddeelen en keratohyaline kon aantoonen, komt hij tot het resultaat, dat de korrels zich niet uit het gewone en waarschijnlijk ook niet uit veranderd chromatine, doch uit een onkleurbaar, nog niet nader bekend, kernbestanddeel vormen, en daarbij of in dezen vorm in het cytoplasma treden om zich daar tot keratohyalinekorrels te vervormen, of reeds in definitieve gedaante de kern verlaten.

Een analoge opvatting werd ook door POSNER verdedigd, aangezien hij aanneemt, dat een substantie uit de kern treedt, in het protoplasma terecht komt en zich daar met protoplasmabestanddeelen tot de keratohyalinekorrels verbindt.

UNNA meende, dat het keratohyaline de uitdrukking zou zijn van het min of meer gemodificeerde chromatine met het granoplasma der cel. Van belang, vooral om later in hoofdstuk VI uiteen te zetten redenen, zijn de histochemische onderzoekingen, welke door UNNA en zijn leerlingen over het mechanisme der

verhoorning zijn verricht. Reeds in 1876 had deze onderzoeker opgemerkt, dat het stratum granulosum niet onmiddellijk in het stratum lucidum overgaat, doch dat tusschen deze beiden zich nog een andere laag bevindt, het stratum intermedium, of stratum infrabasale. Langs histochemischen weg (gebruik van osmiumzuur en chroomzuurmengsels) kwamen UNNA en GOLODETZ (1908) tot de opvatting, dat zich de totale voorraad der huid aan vetachtige stoffen in het stratum corneum bevindt. En wel zou hier in hoofdzaak het oliezuur aanwezig zijn, terwijl andere vrije vetzuren en waarschijnlijk ook cholesterine-esters in mindere mate vertegenwoordigd voorkomen. Het stratum intermedium, dat nòch keratohyaline, nòch eleïdine bevat, zou rijk zijn aan glykogeen. De verschillende keratinesoorten, die de onderzoekers in het stratum corneum onderscheiden, kunnen met stilzwijgen worden voorbijgegaan. Volgens UNNA en GOLODETZ zou het keratohyaline in het stratum granulosum afgebroken worden tot glykogeen (zichtbaar in het stratum intermedium) en een basische albumine, die het eleïdine vormt. Het glykogeen komt niet als zoodanig voor, doch als een glykoproteïed, diffuus verdeeld in een dunne laag, welke evenwijdig aan het huidoppervlak verloopt. In de meer oppervlakkig gelegen lagen der huid komt dit glykoproteïed alleen rondom de zweetporiën voor. In het overige gedeelte dezer lagen is het glykogeen niet meer in den genoemden vorm aanwezig, doch is hier overgegaan in het oliezuur. Het glykogeen in het stratum intermedium moet dus beschouwd worden als een voorstadium van het oliezuur en andere vetzuren van het stratum corneum.

De anisotropie van het protoplasma in het stratum spinosum en de isotropie der keratohyalinekorrels leveren volgens ARCANGELI (1909) een duidelijke vingerwijzing, dat de laatsten niet uit het eerste zijn ontstaan. Zij moeten dus van karyogene herkomst zijn. En inderdaad meende deze onderzoeker in het verhoornde oesophagusepitheel bij caviae in enkele gevallen het uittreden van deeltjes uit de kern in het protoplasma, waar ze tot de genoemde korrels werden, te hebben waargenomen. Het keratohyaline is volgens ARCANGELI dan ook niets anders als het uit de kern getreden chromatine, welke uittreding tot stand

komt door de degeneratieve processen, die in de celkern gedurende het verhoorningsproces plaats hebben.

KOLLMANN en PAPIN (1915) hebben het verhoornde epitheel van den oesophagus bij verschillende dieren onderzocht. Zij vonden een uittreding der nucleoli uit de kern in het cytoplasma en beschouwen deze uitgetreden nucleoli als de moederstof voor de keratohyalinekorrels. De korrels stellen niets anders voor als het eerste product der, op een bijzondere wijze verloopende, kerndegeneratie van de cellen in het stratum Malpighi. In overeenstemming met deze theorie blijkt, dat bij caviae en ratten, waar een totale degeneratie der kern optreedt, de aanwezigheid der keratohyalinekorrels wordt waargenomen, terwijl in het oesophagusepitheel van runderen en schapen, waar de kernen blijven bestaan en slechts onvolledig degenereeren, de granula gemist worden.

Bij het microscopisch onderzoek der huid van de Javaansche karbouw (*Bos bubalus Javaneus*) merkte DE MOULIN op, hoe reeds in het protoplasma der cellen van het stratum filamentosum kleine basophiele korrels voorkomen, die in aantal toenemen, hoe meer de cellen het huidoppervlak naderen. In het stratum granulosum vullen zij als onregelmatige klompjes de cel op, en laten tusschen zich een netwerk van protoplasmadraadjes vrij. De kernen platten zich, gelijk de cellen, niet alleen hoe langer hoe meer af, naarmate zij naar de vrije oppervlakte toe verschoven worden, doch ook laten zij zich hoe langer hoe slechter kleuren, totdat in het stratum granulosum vele kernen in het geheel geen kleurstof meer opnemen, en het uiterlijk van vacuolen hebben. Uit deze beelden meent de schrijver te mogen opmaken, dat de kernen stoffen aan het protoplasma afstaan, en dat de granula uit basophiele kernsubstanties opgebouwd zijn. Het bewijs voor de juistheid dezer opvatting leverde de bestudeering van afgeschaafde huidepitheelcellen in een sterk visceuse emulsie van Arabische gom bij 35° C. Terwijl in de eerste oogenblikken de cellen een homogeen uiterlijk bezitten, verandert het aspect spoedig, en ziet men na een poos de netstructuren in het protoplasma optreden, terwijl in de mazen van het net kleine lichtbrekende korrels ontstaan. Het geheel lijkt volkomen op het beeld van het stratum filamentosum in gefixeerde microscopische praeparaten. Werd een weinig methyleenblauw-

oplossing toegevoegd, dan kleurde het protoplasma van sommige cellen zich sterk, van anderen zwak. Opvallend hierbij was, dat de mogelijkheid om de kern te kleuren in omgekeerde verhouding stond tot de kleurbaarheid van het protoplasma. In cellen met sterk gekleurd protoplasma vertoont de kern zich hoogstens als een vacuole. Een verklaring voor de aanwezigheid der keratohyalinekorrels in het stratum granulosum is volgens De Moulin de volgende: Hoe oppervlakkiger de cellen gelegen zijn, hoe meer zij bloot staan aan uitdroging, daar de voedsel- en vochtvoorziening van uit het bindweefsel slechts gebrekkig kan plaats hebben. De concentratie en de inwendige wrijving der cellen wordt dus grooter, hoe meer deze naar de oppervlakte toe worden gedrongen. Ook de kern staat aan de uitdrogende werking bloot en als gevolg daarvan zullen vloeibare kernsubstanties door de kernmembraan in het protoplasma diffundeeren. Deze stoffen zijn basophiel en vormen de zoogenaamd uit het keratohyaline opgebouwde korrels van het stratum granulosum. Het geheele wezen van het verhoornings proces bestaat slechts in het diffundeeren van kernsubstanties door de kernmembraan heen.

Eigen onderzoek.

Het samengesteld plaveiselepitheel der volgende organen werd onderzocht:

1° muizentong, gefixeerd in sublimaat en in absoluten alcohol.
2° vingertop van den mensch, gefixeerd in vloeistof van Zenker.
3° huid (ooglid) van pasgeboren muis, gefixeerd in vloestof van Bouin.
4° voetzool van pasgeboren kat, gefixeerd in sublimaat en in abs. alcohol.
5° kaak van een pasgeboren hond, gefixeerd in vloeistof van Zenker en ontkalkt in pikrinezuren alcohol.
6° kaak van een hond van 12 dagen, gefixeerd in vloeistof van Hofker en ontkalkt in trichlooraziinzuur.
7° oesophagus van een menschelijk embryo van 37 c.M. lengte, gefixeerd in vloeistof van Hofker.
8° vagina van een muis, gefixeerd in sublimaat en in abs. alcohol.

9° vagina van een vrouw, gefixeerd in vloeistof van ZENKER en in formol.

Behalve de nuclealreactie werden de volgende kleuringen toegepast:

haematoxyline-eosine; ijzerhaematoxyline van HEIDENHAIN; kleuring volgens DOMINICI; methylgroen-pyronine volgens UNNA; safraninekleuring voor het aantoonen van zure kernen volgens UNNA.

Van de meeste onderzochte verhoornde weefsels was het keratohyaline van het stratum granulosum als duidelijke korrels van verschillende grootte waar te nemen; in andere praeparaten had zich het protoplasma dezer laag diffuus met basische kleurstoffen gekleurd, zonder dat van afzonderlijk liggende korrels iets te zien was. Een gunstig object voor de studie der verhoorning bleek vooral de muizentong te zijn.

De resultaten, welke de toepassing der nuclealreactie op de genoemde organen heeft opgeleverd, zijn de volgende: De kernen van het stratum basale kleuren zich duidelijk; de kernen van de daarboven liggende lagen kleuren zich des te zwakker, naarmate zij dichter bij de oppervlakte komen. In dit opzicht is het beeld der nuclealpraeparaten geheel gelijkvormig aan die van met haematoxyline behandelde. Indien een kernschim ook nog maar eenigszins met haematoxyline te kleuren is, reageert zij ook positief met fuchsinezwaveligzuur. In de organen, waar verhoorning van het epitheel was opgetreden, waren met de methode van FEULGEN en ROSSENBECK geen keratohyalinekorrels aantoonbaar. Noch bij kortdurende, noch bij langdurende hydrolyse, gecombineerd met verschillende hydrolysetemperaturen, noch bij achterwege laten der hydrolyse, was in een enkel praeparaat iets van paars gekleurde korrels te zien. Een uittreding van nucleoli uit de kern kon met de nuclealkleuring niet worden waargenomen.

In praeparaten, welke met de safranine-tanninemethode volgens UNNA behandeld waren, werden evenwel beelden gezien, welke zeer veel gelijkenis vertoonen met de door KOLLMANN en PAPIN beschrevene. Men vindt n.l., dat de meeste cellen van het stratum granulosum zure kernen bevatten, en dat de keratohyalinekorrels zich op dezelfde wijze kleuren als deze kernen. In sommige cellen krijgt men den indruk, alsof inderdaad roode korrels uit de kern

in het protoplasma treden. Of dit wijst op het uittreden van nucleoli in het protoplasma, welke daar dan tot keratohyalinekorrels worden (zooals KOLLMANN en PAPIN meenen), of dat slechts keratohyalinekorrels, welke zich met deze methode op dezelfde wijze gekleurd hebben als de in de kern liggende nucleoli, toevallig tegen de kern aanliggen, moet in het midden worden gelaten.

Met de nuclealreactie werd behalve een kernkleuring nog een meer of minder sterke diffuse kleuring der overige weefselbestanddeelen in het epitheel opgemerkt. Deze diffuse violetkleuring was in de epitheliën der verschillende organen niet steeds constant; een enkele maal werd zij gemist, in de meeste gevallen was zij aanwezig. Wat de localisatie der kleuring betreft: in het algemeen kon worden waargenomen, dat deze 1 à 2 cellagen vanaf het stratum cylindricum gelegen begon, naar de oppervlakte toe in intensiteit toenam, tot het maximum was bereikt in die laag, waar juist alle kernen zijn gedegenereerd (d.i. dus overeenkomend met het door UNNA genoemde stratum intermedium) en dan naar het vrije oppervlak toe weer geleidelijk minder werd. Ook werd wel eens gezien, dat het meest oppervlakkig liggende deel van het stratum corneum zich wat intensiever kleurde.

Het is bekend, dat de verhoorning der verschillende epitheliën niet altijd op dezelfde wijze plaats heeft. Behalve morphologische zijn ook chemische verschillen tusschen bepaalde hoornsubstanties aan te toonen. Volgens UNNA en GOLODETZ (1908; 1913) zouden de cellen van de epidermis alleen een volkomen verhoornde peripherie vertoonen, terwijl de centrale massa slechts gedeeltelijk en op een wijze, afwijkend van die der overige verhoornt. De periphere substantie wordt keratine-A, de centrale keratine-B genoemd. Chemisch zouden deze stoffen zich daarin onderscheiden, dat het keratine-A zeer resistent is tegen de inwerking van verschillende chemische reagentia als zuren en alkaliën, terwijl het keratine-B gemakkelijk oplosbaar zou zijn in verdunde alkaliën. Bij de verhoorning der cellen van de nagelmatrix zou in hoofdzaak het keratine B in het geheele cellichaam worden gevormd; in tegenstelling met de overige huidepitheliën zijn de nagelcellen dus rijk aan dit keratine B. Terwijl bij het haar de cuticula pili uit keratine A is opgebouwd,

gedragen schors en merg zich anders tegenover chemische reagentia dan de beide genoemde keratinesoorten. Van het keratine A onderscheiden zij zich b.v. door het bezit van een positieve xanthoproteïnereactie, van het keratine B door hun onoplosbaarheid in rookend salpeterzuur. Door UNNA en GOLODETZ is aan deze stof de naam keratine C toegekend. Bovendien zou het haarmerg naast dit keratine C nog een stof bevatten, waaraan de naam van trichohyaline is gegeven; deze stof zou onoplosbaar zijn in sterke loogen, oplosbaar in sterke zuren.

Voor het bestudeeren dezer verschillende hoornsubstanties werden naast de cellen van de epidermis de haren, voorkomend in verschillende stukjes van de onderzochte huid, nagegaan. Als onderzoeksmateriaal naar de bestanddeelen der nagelcellen, dienden vingertoppen van foetus van menschen, ratten en muizen. Bij toepassing der nuclealreactie kon in het haar, behalve aan de gedegenereerde kernen der schors, geen andere positieve reactie worden waargenomen. De uitkomsten welke aan de nagelcellen werden verkregen, komen geheel overeen met die welke bij de epidermiscellen werden gevonden. Ook in het nagelepitheel treft men een meer of minder breede zône aan welke zich met het fuchsinezwaveligzuur diffuus licht-violet kleurt, ook zonder voorafgaande hydrolyse.

Voor het optreden dezer diffuse violette kleuring in de epidermis en in de nagelcellen komen nu de volgende verklaringen in aanmerking:

1° Het is een kunstproduct, veroorzaakt door het onvolledig uitspoelen van het zwaveligzure fuchsine uit het compacte stratum intermedium en stratum corneum, dat voor water moeilijker te doordringen is dan het overige weefsel. Hiermee zou ook in overeenstemming zijn, dat niet-gehydrolyseerde praeparaten de diffuse kleuring vertoonen. Deze veronderstelling, waar het eerste oogenblik aan gedacht was, blijkt echter onjuist te zijn, aangezien vergelijkingen tusschen een gewone en een langdurige spoeling van hetzelfde praeparaat geheel dezelfde uitkomst gaf. Van een vermindering in intensiteit viel niets waar te nemen.

2° De nucleoproteïden bevattende keratohyalinekorrels laten gedurende de hydrolyse hun nucleïnezuur los, dat juist dan diffuus over het overige epitheel verspreid wordt. Ook deze verklaring

kan niet de juiste zijn, aangezien de violette kleur zich nooit verder dan over het epitheel uitstrekt, en aangezien verder niet-gehydrolyseerde praeparaten hetzelfde beeld vertoonen. Bovendien, indien de keratohyalinekorrels nucleïnezuur zouden bevatten, hetgeen uit hun basophilie wordt opgemaakt, dan zou na hydrolyse dit nucleïnezuur hier nog aanwezig moeten zijn, aangezien gehydrolyseerde coupes, gekleurd met haematoxyline en eosine basophiele keratohyalinekorrels vertoonen.

3° Bij de gedurende het verhoorningsproces optredende kerndegeneratie, wordt chromatine aan het protoplasma afgestaan. Goed hiermee te rijmen is, dat de plaats, waar de degeneratie het sterkst is uitgesproken, ook de sterkste reactie geeft. Ook deze opvatting moet op grond van de volgende overwegingen verworpen worden:

a. Een uittreden van chromatinedeeltjes uit de kern, zooals die bij andere kerndegeneraties is aangetoond (b.v. in de bekkenklier van salamanders) werd hier nooit waargenomen.

b. Het zou mogelijk zijn, dat geen chromatine-afgifte in den vorm van deeltjes plaats heeft, doch dat een diffusie van vloeibare nucleïnezuurbestanddeelen door de kernmembraan tot stand komt, zooals in de epitheelcellen van den tractus digestivus van *Sphaeroma* en *Idothea* werd gezien. Men zou in dit geval echter, na toepassing der nuclealreactie, dezelfde uitkomsten mogen verwachten, als bij genoemde epitheelcellen werden waargenomen. Hier bleek, dat de door diffusie uit de kern getreden bestanddeelen alleen na hydrolyse zich met het reagens van SCHIFF violet kleuren. Achterwege laten der hydrolyse had nòch hier, nòch in andere weefsels waar chromatine aan het protoplasma wordt afgestaan, een positieve reactie ten gevolge. In de epidermis ziet men echter, dat de hydrolyse niet den minsten invloed heeft op den uitslag der reactie; hetzelfde resultaat wordt bereikt, hetzij er al of niet hydrolyseeren er aan is voorafgegaan.

Op grond van deze overwegingen moet worden aangenomen, dat de kleurbare massa niet uit nucleïnezuur bestaat.

4° De diffuse kleuring wordt veroorzaakt door een andere, nog onbekende stof. Deze hypothese is de meest waarschijnlijke. Niet uitgemaakt kan echter worden, of deze stof afkomstig is uit de kern, of in het protoplasma zelf ontstaat.

Samenvattend, is dus uit deze onderzoekingen gebleken, dat de meening van verschillende schrijvers, dat uit de kern basophiele bestanddeelen in den vorm van chromatinekorrels of nucleoli uittreden, niet kan worden bevestigd. Ook een diffuse uittreding van chromatine kan niet aannemelijk worden gemaakt. Hiermee is dus aangetoond, dat de keratohyalinekorrels niet uit nucleïnezuurverbindingen bestaan. Er blijft slechts over aan te nemen, dat de zich met zwaveligzure fuchsine kleurende, diffuus verspreide, substantie chemisch anders is samengesteld dan het nucleïnezuur. Of deze stof wellicht toch van de kern afkomstig is, kon niet worden uitgemaakt.

F. De lichaampjes van Nissl in gangliecellen.

De door Flemming (1882) het eerst geziene, doch vooral door onderzoekingen van Nissl (1894) bekend geworden basophiele, naar den laatsten onderzoeker genoemde, lichaampjes in gangliecellen zijn sedert hun ontdekking het voorwerp geworden van tallooze proefnemingen, niet alleen door histologen, doch ook door physiologen en vooral door pathologen verricht. Terwijl Nissl zich niet uitliet over de vraag of de door hem aangetoonde structuren in de gefixeerde cel ook overeenkwamen met die in de levende, meende Held (1897), dat de tigroiedlichaampjes tevoorschijn geroepen werden door een bij de fixatie (met zuurhoudende fixatieven) neergeslagen eiwit, hetwelk gedurende het leven zich in opgelosten toestand in het protoplasma der gangliecellen bevond, m.a.w. een kunstproduct zouden zijn. Held voerde voor deze meening twee argumenten aan: in ongefixeerde cellen zouden de lichaampjes niet te zien zijn: na fixatie in alkalische vloeistoffen waren deze structuren evenmin zichtbaar. Door Lenhossek (1895) werden deze lichaampjes echter wel in levend weefsel aangetroffen, en ook Bethe (1903) geeft aan in gangliecellen der ongefixeerde voorhoorns van het kikvorschenruggemerg de tigroiedklompjes meermalen waargenomen te hebben. Wel is waar traden de beelden bij het afsterven der weefsels hoe langer hoe duidelijker op, hetgeen evenwel volgens Bühler (1895) en Bethe er niet tegen behoeft te pleiten, dat ook tijdens het leven deze structuren aanwezig waren. Immers kan bij de levende cel het verschil in lichtbreking tusschen deze

lichaampjes en het omgevende plasma zoo gering zijn, dat het oog beiden moeilijk van elkaar onderscheiden kan. Ook het argument, dat alkalische fixatieven de tijgervelteekening der cellen niet te voorschijn roept, moet als weinig steekhoudend worden verworpen, daar alkaliën in staat zouden kunnen worden geacht een oplosmiddel te zijn voor de stof, waaruit de lichaampjes zijn opgebouwd.

De vraag, of de lichaampjes van NISSL reeds in de levende cel aanwezig zijn, of pas gedurende het afsterven of tijdens de fixatie ontstaan, heeft sindsdien nog vele onderzoekers beziggehouden.

Zoo werden door MARINESCO (1905) levende gangliecellen met het ultramicroscoop bestudeerd met dit resultaat, dat het bestaan der tigroïedlichaampjes hiermee niet kon worden aangetoond. Elders (VOORHOEVE 1924) heb ik uiteengezet, dat deze uitkomst de veronderstelling van BETHE niet weerlegt, omdat zelfs met het ultramicroscoop in een kolloidaal systeem geen structuren kunnen worden herkend, indien de brekingsverschillen tusschen structuur en omgevende stof gering zijn.

Door DE MOULIN (1923) is niet lang geleden dit vraagstuk opnieuw ter hand genomen met gebruikmaking van een nieuwe methode, waarbij het weefsel in een mengsel van het glasvocht uit het oog en gelatine werd onderzocht. In zoo'n medium bestudeerd bleken gangliecellen geen tigroiedklompjes te bevatten; deze ontstonden pas later als kolloïedchemische veranderingen in celkern en protoplasma den naderenden dood aankondigden.

Nadat door PH. STÖHR Jr. gefixeerde gangliecellen door middel van ultraviolet licht waren gephotographeerd, heeft WEIMANN (1924) deze proeven op versche voorhoorncellen van het ruggemerg herhaald. Beiden vonden, dat naast de kernmembraan en nucleolus, een duidelijk beeld op de photographische plaat werd verkregen van de lichaampjes van NISSL. Daarbij vertoonden de chromatinepartikels in de kern en de tigroïedlichaampjes in het celplasma volkomen hetzelfde beeld, al kon een uittreden van chromatine uit de kern ook niet worden vastgesteld.

Behalve over het al of niet voorkomen in levende cellen is vooral gestreden over de chemische geaardheid en de herkomst dezer korrels. Het behoeft geen verwondering te wekken, dat in een tijd, toen men tot het chromatine al die celbestanddeelen rekende,

welke zich met kernkleurstoffen kleurden, ook de stof, waaruit de lichaampjes van NISSL waren opgebouwd, als chromatinehoudend werd beschouwd en een karyogene herkomst hiervan werd aangenomen. Onderzoekingen van R. HERTWIG hadden aan het licht gebracht, dat in cellen een bepaalde verhouding bestaat tusschen hoeveelheid protoplasma en hoeveelheid karyoplasma (de z.g. wet der kernplasmarelatie van HERTWIG). Vermeerdering of vermindering van de eene soort plasma heeft een vermeerdering of vermindering van de andere soort ten gevolge. Indien de ganglicel met haar groote hoeveelheid protoplasma slechts karyoplasma in haar groote, doch zeer chromatinearme kern zou bezitten, beteekende dit een verschuiving der kernplasmaverhouding ten gunste van het cytoplasma. Als maatregel hiertegen zou nu de zenuwcel het ontbrekende chromatine in het celplasma hebben opgehoopt. Verschillende argumenten pleitten sterk voor deze opvatting en dus voor de meening, dat de lichaampjes van NISSL uit kernmateriaal waren opgebouwd. Zoo bleken ganglicellen van urodelen geen tigroïed te bezitten, waar tegenover stond, dat deze cellen een groote chromatinerijke kern bezaten. In overeenstemming met de wet van HERTWIG was, dat doorsnijding met daaropvolgende degeneratie van celuitloopers (m.a.w. een verlies aan hoeveelheid protoplasma) gepaard ging met een vermindering van hoeveelheid tigroïedsubstantie.

Het heeft niet aan onderzoekingen ontbroken, welke een directen overgang voor dit plasmachromatine uit de celkern trachtten aan te toonen. Zoo meenen ROHDE (1904) en HOLMGREN (1906) in cellen uit het spinaalganglion van Lophius piscatorius het uittreden van kernbestanddeelen in het protoplasma te hebben waargenomen. SCOTT (1899) gelooft uit zijn praeparaten van varkensembryonen te kunnen opmaken, dat chromatine uit de kern in het cytoplasma door diffusie treedt en hier tot lichaampjes van NISSL verandert. Door GOLDSCHMIDT werden de tigroïedklompjes als uit de kern getreden chromidiën beschouwd. DE MOULIN heeft met zijn nieuwe methode aan ganglicellen der ventrale ruggemergshoorns van het paard, waarbij tevens vitaal met methyleenblauw gekleurd werd, de korrels van NISSL uit de kern zien ontstaan.

Naast deze morphologische onderzoekingen is ook gepoogd

langs chemischen weg wat naders te weten te komen omtrent den aard der tigroïedsubstantie. Zoo meende HELD uit de oplosbaarheid der lichaampjes in alkaliën en haar onoplosbaarheid in zwakke zuren en maagsap te moeten opmaken, dat zij uit nucleoalbuminen zijn opgebouwd. Bovendien gelukte het hem met behulp der methode van LILIENFELD en MONTI er microchemisch phosphor in aan te toonen. Ook SCOTT kon deze aanwezigheid van phosphor in tigroïedlichaampjes bevestigen. Verder was hij in staat ook de aanwezigheid van ijzer hierin vast te stellen. In nucleoproteïden wordt n.l. het voorkomen van ijzer regelmatig beschreven. Het gelukte MACALLUM (1908) dit aan organische stoffen gebonden ijzer microchemisch in den vorm van ijzersulfide aan te toonen, door op het weefsel een mengsel van gelijke deelen ammoniumthiohydraat (NH_4 SH) en 50 % glycerine te laten inwerken; door de vorming van het FeS neemt het chromatine een groenachtige tint aan. Met deze methode van MACALLUM vond SCOTT nu ook de lichaampjes van NISSL ijzerhoudend.

MUHLMANN (1911; 1912) onderzocht de verterende werking van verschillende zuren, alkaliën en zouten op het tigroïed in verschillende ontwikkelingsstadia van het zenuwstelsel. Daartoe werden de in sublimaat, ZENKER-formol of alcohol gefixeerde en in paraffine ingesloten deelen van ruggemerg en spinaalgangliën aan de werking van deze reagentia blootgesteld. Het bleek, dat de lichaampjes van NISSL niet aangetast werden door een zwakke oplossing van zoutzuur, gedestilleerd water, glauberzout- en keukenzoutoplossingen, terwijl ze door kaliloog, sterke zoutzuuroplossing en trypsine verteerd werden. Eigenschappen dus, die karakteristiek zijn voor nucleïnen. Na inwerking van maagsap en kleuring met methyleenblauw werd hetzelfde beeld verkregen als vóór de inwerking; ook dit komt overeen met het nucleïnekarakter. Daar stond echter tegenover, dat kleuring met methylgroenpyronine een ander beeld gaf. Het bleek n.l., dat de substantie, die het pyronine aantrekt, door het maagsap verteerd werd; in de eerste stadia na inwerking blijft een zwak rood gekleurde massa over, die bij verdere inwerking van chromophilie verandert en ten slotte wordt tot een wazig blauw gekleurde tigroïedmassa. De pyroninophile massa is dus door het maagsap verteerd geworden. Op grond van deze uitkomsten neemt MUHLMANN aan, dat de

lichaampjes van NISSL uit twee eiwitcomplexen zijn opgebouwd, een nucleïne en een zich met pyronine kleurend neuroglobuline.

Door Mej. VAN HERWERDEN (1913) is de werking van nuclease op de tigroïedlichaampjes nagegaan en aangetoond, dat zij, aan de inwerking van het enzym blootgesteld, in oplossing gingen.

Terwijl al de genoemde onderzoekingen sterk voor de chromatinenatuur (HEIDENHAIN (1907) spreekt zelfs van het „cytochromatine" der gangliecellen) en de aanwezigheid van nucleïnezuur in het tigroïed spreken, hebben UNNA (1913) en zijn medewerkers zich sterk tegen deze opvatting gekant. Volgens UNNA, GANS, GOLODETZ, LENHOFF zouden de lichaampjes van NISSL identiek zijn met het granoplasma van andere cellen en chemisch uit cytose bestaan. Onder granoplasma wordt door UNNA verstaan een basophile substantie, die in den vorm van amorphe korrels (in tegenstelling met de ronde granula van EHRLICH in leucocyten en van ALTMANN in kliercellen) in het protoplasma van vele levende of in alcohol gefixeerde cellen voorkomt. Dit granoplasma zou steeds uit eenzelfde eiwit gebouwd zijn, een deuteroalbumose, waaraan UNNA den naam van cytose (celalbumose) gegeven heeft. De meening, dat de lichaampjes van NISSL uit dit cytose zouden zijn opgebouwd, baseert UNNA vooral op grond van uitkomsten met de methylgroen-pyroninekleuring. Methylgroen zou immers een kleurstof zijn, welke alleen nucleïnen kleurt, terwijl pyronine door alle andere zure eiwitten wordt aangetrokken. Uit het feit, dat bij methylgroen-pyroninekleuring van gangliecellen alleen de celkern zich met methylgroen kleurt, terwijl de tigroïedlichaampjes de roode kleurstof aantrekken, blijkt, dat de laatste niet uit nucleïnezuur, doch uit een zuur eiwit bestaan, overeenkomend met het cytose in andere cellen. Tegen de onderzoekingen van MUHLMANN brengt UNNA in, dat verteringsproeven op eiwitten, die eerst door middel van fixatievloeistoffen een verandering in physischen en wellicht ook in chemischen zin hebben ondergaan, niet als betrouwbaar mogen worden beschouwd. Dit argument heeft door onderzoekingen van GROSZ (zie blz. 11) veel aan waarde gewonnen.

Tegenover de door UNNA getrokken conclusies op grond van uitkomsten met de methylgroen-pyroninekleuring staat echter, dat MUHLMANN wel degelijk een kleuring der lichaampjes van NISSL

met methylgroen, zij het ook een zeer zwakke, kon aantoonen. Terwijl het tigroïed in de gangliecellen van jonge embryo's zuiver pyroninophiel is, zag hij bij oudere embryo's een verandering der chromophilie optreden, een bewijs, dat bij deze dieren een stof in de tigroïedlichaampjes aanwezig is, welke ook het methylgroen aantrekt.

Na de eerste mededeelingen van FEULGEN en ROSSENBECK is van andere zijde onmiddellijk gepoogd de nuclealreactie ook op de lichaampjes van NISSL toe te passen. Het eerst is dit door VOSS (1925) verricht, waarbij echter uit de verkregen uitkomsten door den onderzoeker niet zeker kon worden uitgemaakt, of deze lichaampjes positief of negatief reageerden. Intusschen is het aan REDENZ (1925) gelukt met een kleine verandering in de oorspronkelijke methode (welke in een hydrolyseering bij lagere temperatuur schijnt te bestaan) een positieve kleuring met het zwaveligzure fuchsine te verkrijgen.

Eigen onderzoek.

Onderzocht werd het ruggemerg van konijnen, honden en ratten. Gefixeerd werd in sublimaat of in absoluten alcohol, waaraan azijnzuur tot een hoeveelheid van 5 % was toegevoegd. Uit vergelijkingen van zenuwweefsel, dat in azijnzuurhoudenden alcohol was gefixeerd met dat, hetwelk bij afwezigheid van het azijnzuur gefixeerd was, bleek, dat toevoeging der laatste stof veel duidelijkere beelden van tigroïedlichaampjes gaf.

Het op deze wijze gefixeerde weefsel gaf volgens de methode van FEULGEN en ROSSENBECK behandeld de volgende uitkomsten omtrent de kleuring der lichaampjes van NISSL:

Hydrolyse bij	60° C.	gedurende	4	min.	geen reactie
„ „	60° C.	„	3	„	geen reactie
„ „	60° C.	„	2	„	geen reactie
„ „	60° C.	„	1	„	zwakke kleuring
„ „	55° C.	„	5	„	geen reactie
„ „	55° C.	„	3	„	zwakke kleuring
„ „	55° C.	„	1	„	zwakke kleuring
„ „	50° C.	„	5	„	zwakke kleuring

Hydrolyse bij	50° C.	gedurende	3	min.	zwakke kleuring
„ „	50° C.	„	1	„	zeer zwakke kleuring
„ „	40° C.	„	10	„	zwakke kleuring
„ „	40° C.	„	5	„	geen kleuring
„ „	40° C.	„	1	„	geen kleuring
„ „	18° C.	„	24	uur	geen kleuring
„ „	18° C.	„	7	„	zwakke kleuring
„ „	18° C.	„	1	„	geen kleuring

Uit deze uitkomsten blijkt, dat de in de lichaampjes van NISSL aanwezige zwak-positief reageerende stof, zich gedraagt als het thymonucleïnezuur in de nucleïnezuurhoudende kernbestanddeelen, met dit verschil, dat hydrolyse hier een veel sterkere inwerking op schijnt uit te oefenen. Men kan dit zoo verklaren, dat de hoeveelheid nucleïnezuur in het tigroïed zóó gering is, dat reeds een geringe hydrolytische werking voldoende is, om dit aanwezige zuur zoodanig te splitsen, dat het nucleal niet meer kan worden aangetoond. Op een directe inwerking van het reagens van SCHIFF zonder voorafgaande hydrolyse reageeren de lichaampjes negatief.

Het is dus zeer waarschijnlijk, dat de positieve reactie der lichaampjes veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van een geringe hoeveelheid thymonucleïnezuur, al moet de mogelijkheid worden toegegeven, dat zich in het tigroïed een andere stof als de laatstgenoemde bevindt.

Neemt men de aanwezigheid van een zeer geringe hoeveelheid thymonucleïnezuur aan, dan zijn de negatieve (althans niet met zekerheid als positief te beschouwen) uitkomsten van VOSS begrijpelijk. In die gevallen werd n.l. op de gewone wijze gehydrolyseerd, waarbij dus het thyminezuur reeds in lagere afbraakproducten was uiteengevallen.

Of het nucleïnezuur in het protoplasma zelf gevormd wordt, of uit de celkern afkomstig is, moet in het midden worden gelaten. Uit mijn eigen praeparaten kon ik hieromtrent geen nadere gegevens putten. Het geringe gehalte der tigroïedlichaampjes aan nucleïnezuur zou niet tegen de meening van HATAI (1904) pleiten, volgens welke in de cellen van het spinaalganglion bij ratten nucleoli door de kernmembraan in het protoplasma treden en daar

aanleiding geven tot de vorming van de lichaampjes van NISSL. Ook MAY en WALKER (1908) troffen regelmatig in ganglicellen van verschillende zoogdieren het uittreden van nucleoli uit de kern aan.

Zooals reeds gezegd is: de resultaten met de nuclealreactie verkregen pleiten niet tegen deze opvatting, noch tegen die van SCOTT en HOLMGREN, waarbij uit de kern chromatinekorrels in het protoplasma zouden worden uitgestooten; een bewijs er voor vormen zij evenmin.

G. De genese van het melaninepigment.

Nadat uit microchemische onderzoekingen, van welke vooral die van HUECK (1921) mogen worden genoemd, was gebleken, dat het melaninepigment niet uit het heamoglobine afkomstig is, en nadat proeven van MEIROWSKY (1908) e.a. (in ons land o.a. van DE LIGNAC, 1922), waarbij uitgesneden stukjes huid, op bepaalde temperatuur bewaard, een sterkere pigmentatie gingen vertoonen als vóór de explantatie, overtuigend hadden aangetoond, dat het melaninepigment niet in opgelosten toestand met het bloed aan de pigmenthoudende cellen wordt toegevoerd, kon de vraag beantwoord worden, op welke wijze in de cel zelf het pigment ontstaat.

Door vroegere onderzoekers was reeds opgemerkt, dat ongekleurde granula, waaromheen (of waarin) zich melanine afzette, als de voorstadia van de latere pigmentkorrels moeten worden opgevat; aan deze ongekleurde voorstadia werd de naam van propigment toegekend. Het is bekend, dat ALTMANN, door waarnemingen op pigmentcellen, zich de vraag voorlegde, of wellicht niet in het protoplasma van andere cellen deze korrels, zij het dan in ongekleurden toestand, aanwezig waren. Het zou er dan slechts op aankomen deze korrels met behulp van geschikte fixatiemiddelen en kleuringen aan te toonen. Met de uitwerking van dezen gedachtengang heeft hij den grondslag gelegd voor zijn zoo bekend geworden granulatheorie over den bouw van het protoplasma.

De gedachtengang van ALTMANN en de resultaten van diens onderzoekingen beschouwend, ligt het voor de hand de praepigmentkorrels te identificeeren met de granula van ALTMANN

in het protoplasma (de mitochondriën, chondriosomen, enz. der latere onderzoekers), en aan te nemen, dat door bepaalde chemische processen dit praepigment in het pigment zou overgaan. In overeenstemming met deze opvatting bleken de proeven van REINKE (1894), waarbij onder invloed van oxydeerende middelen (waterstofsuperoxyde) het zwarte melanine verdween, en kleurlooze korrels overbleven, welke zich met bepaalde kleurstoffen (safranine) kleurden. REINKE identificeert deze kleurlooze korrels met de bioblasten van ALTMANN, en meent dan ook door zijn onderzoekingen een belangrijke bijdrage geleverd te hebben voor de bioblastenleer.

Van de latere onderzoekers, welke de meening zijn toegedaan, dat de pigmentkorrels uit chondriosomen hun oorsprong nemen, mogen worden genoemd: CHAMPY, LUNA, LEPLAT, PRENANT, BUSACCA.

CHAMPY (1911—'12) beschouwt de cellen van het buitenste retinablad als een secerneerend epitheel; evenals de cellen van het pancreas, de nier of van andere kliercellen bezitten zij een basale voedingspool, naar de chorioidea gericht, en een pigmentpool, welke als secretiepool is op te vatten, gericht naar de staafjes en kegeltjes. Aan de voedingspool trof hij chondriosomen aan, welke naar de secretiepool toe spits eindigden. Bovendien werd hier een uiteenvallen in spoelvormige korrels aangetroffen, welke in het begin ongekleurd waren, bij de verdere ontwikkeling echter zich hoe langer hoe sterker bruin kleurden. LUNA (1912; 1913) bestudeerde de pigmentgenese in de retina bij larven van *Bufo vulgaris* en van kippenembryo's, welke verschillend langen tijd bebroed waren. In de cellen van het buitenblad trof hij korrels, staafjes en ringvormige structuren aan, welke voor chondriosomen werden gehouden. Bij de verdere ontwikkeling werd waargenomen, hoe deze chondriosomen geheel overgaan in bruine pigmentkorrels. LEPLAT (1912) heeft bij zijn onderzoekingen over de ontwikkeling en structuur der chorioidea van vogels eveneens aandacht besteed aan het ontstaan der pigmentkorrels in de retina; ook hij is tot de opvatting gekomen, dat zij van mitochondriën afstammen. PRENANT (1911) vergeleek de epitheelcellen van de epidermis met die van de cornea bij amphibiënlarven. De huidcellen bevatten pigmentkorrels in haar

protoplasma, de corneacellen waren ongepigmenteerd. Echter vertoonden de laatsten in haar protoplasma chondriosomen, welke, op het gemis der bruine kleur na, volkomen geleken op de pigmentkorrels der epidermis. Op grond hiervan acht de onderzoeker het zeer waarschijnlijk, dat de pigmentkorrels uit de mitochondriën zijn ontstaan. BUSACCA (1912) toonde aan, dat pigmentkorrels in de chorioidea, nadat zij gebleekt waren, zich gedroegen als chondriosomen.

Door verschillende andere onderzoekers wordt echter aangenomen, dat niet cytoplasmatische structuren, doch de celkern een groote rol bij de genese van het melaninepigment zou spelen. Eén der oudste voorstanders van deze meening was MERTSCHING (1888). Volgens zijn, aan haren en aan melanosarcomen verrichte, onderzoekingen ontstaan de pigmentkorrels, in epitheelcellen zoowel als in bindweefselcellen, door degeneratie van de kern; men zou ze het eerst in de omgeving van de kernmembraan zien optreden. JARISCH (1892) bestudeerde pigmentcellen in staarten van amphibia en in de conjunctiva van runderen, en vond in het protoplasma dezer cellen korrels, die zich, evenals het chromatine der celkern, met safranine sterk rood kleurden. Bovendien werden allerlei overgangen aangetroffen tusschen deze rood gekleurde granula en de bruine of zwarte pigmentkorrels. De ligging der safraninophile korrels dicht bij de kern en de eigenschap van beiden zich met safranine te kleuren deden JARISCH tot de overtuiging komen, dat de korrels uit de kern afkomstig waren en zouden bestaan uit chromatine of een stof, die chemisch daarmee nauw verwant is. GALEOTTI (1895) heeft de pigmentkorrels als een stofwisselingsproduct der cel opgevat, waarin ook de kern een aandeel heeft. Bij larven van tritonen en kikvorschen konden, als voorstadia dezer korrels, fuchsinophiele granula worden aangetoond, welke ook in de kern voorkomen. Uit de kern werden zij vervolgens in het protoplasma gestooten om daar de zwarte kleur der pigmentkorrels aan te nemen. Uitvoerige onderzoekingen over de pigmentgenese zijn door RÖSSLE (1904) verricht aan melanosarkomen. In de spoelvormige cellen kon het uittreden van nucleolussubstantie uit de kern worden waargenomen en de verandering van deze substantie in het protoplasma tot pigment. In de chromatinerijke

kernen van jonge cellen ziet men de hoeveelheid nucleolussubstantie hoe langer hoe meer toenemen ten koste van het chromatine. De oorspronkelijk zich bij kleuring met haematoxyline en eosine blauw kleurende kern krijgt hoe langer hoe meer een violette tot roode tint, totdat een ronde (nog ongepigmenteerde) cel met een groote, blazige kern, waarin talrijke nucleoli zich bevinden, is ontstaan (de groote ongepigmenteerde ronde cel van het eerste stadium). Deze cel verandert nu tot een groote ongepigmenteerde spoelcel (2de stadium). Vervolgens gaat de cel protoplasmatische uitloopers uitzenden; de ongepigmenteerde chromatophore van het 3de stadium is nu ontstaan. Eerst nu vangt de pigmentvorming aan; uit de kern worden deeltjes uitgestooten, welke zich tegenover kleurstoffen als nucleolussubstantie gedragen. Tegelijk nemen deze deeltjes een bruine tot zwarte tint aan, en omgeven de kern als een mantel om zich later in het protoplasma te verspreiden. Daarmee is het 4de stadium ontstaan, een groote cel met pigmenthoudende lange uitloopers en een groote blazige kern. Ten slotte verliest de cel haar uitloopers om tot de gepigmenteerde spoelcel van het 5de stadium te worden. De meest maligne cellen van het melanosarcoom zijn die, welke een sterke productie van nucleolussubstantie vertoonen. Naast deze wijze van pigmentvorming werd door Rössle nog een andere aangetoond, waarbij de cel, onder sterke ophooping van nucleolussubstantie in de kern, welke vervolgens in pigmentkorrels wordt overgevoerd, te gronde gaat; door den schrijver werd deze wijze van pigmentgenese den degeneratieven vorm genoemd.

Overeenkomstige waarnemingen als Rössle, n.l. het uittreden van nucleolussubstantie uit de kern in het protoplasma en de verandering er van tot pigmentkorrels, werd door Staffel (1907) waargenomen in de cellen van het xeroderma pigmentosum.

Meirowsky (1906 e.a.) heeft bij een groot aantal onderzoekingen over de genese van het melaninepigment gebruik gemaakt van de methylgroen-pyronine-kleuring volgens Unna, en vond overal, waar pigment gevormd zal worden (hetzij onder normale omstandigheden in de huid van zoogdieren en tritonen, of in het oog, hetzij onder pathologische omstandigheden in naevi of melanosarkomen), een voorafgaande vermeerdering van die substantie in

de kern, welke zich met het pyronine kleurt. Deze pyroninophile massa rangschikt zich tegen de kernmembraan aan en treedt vervolgens uit de kern in het protoplasma, waar ze in den vorm van granula van verschillende grootte te herkennen is. De granula veranderen nu tot pigmentkorrels, doordat, te beginnen met het periphere gedeelte, het granulum geleidelijk tot een bruine of zwarte korrel verandert, daarbij alle nuances tusschen pyroninerood en zwart vertoonend. Sommige granula bezitten aan hun peripherie reeds de pigmentkleur, terwijl het centrum zich nog met pyronine rood kleurt. Uit deze beelden meent MEIROWSKY de conclusie te mogen trekken, dat het pigment uit de celkern afkomstig is, en wel uit het zich met pyronine kleurende gedeelte er van.

VON SZILY (1911) heeft de pigmentgenese in het oog van embryo's van kippen en konijnen en in melanosarcomen, uitgaande van de chorioidea, bestudeerd. In al deze gevallen vond hij, dat de pigmentkorrels uit ongekleurde lichaampjes ontstaan, welke direct van het chromatine van de celkern afstammen en als chromidiën van HERTWIG zijn op te vatten. De kern zendt n.l. uitloopers naar het protoplasma, welke zich hoe langer hoe meer afsnoeren en ten slotte vrij in het celplasma komen te liggen. Deze deeltjes gedragen zich tegenover kleurstoffen volkomen op dezelfde wijze als het kernchromatine. Allerlei overgangen zijn nu te zien tusschen deze, uit de kern afgestooten, chromatinepartikels en de bruin gekleurde pigmentkorrels. Naast deze z.g. „productieve wijze" van pigmentvorming, waarbij de kern ondanks de chromatineafgifte niet te gronde gaat, komt de „degeneratieve wijze" voor, waarbij de geheele kern in stukken uiteen valt, welke vervolgens tot pigmentkorrels worden omgezet. De eerste wijze werd aangetroffen in het pigmentepitheel der retina van kippenembryo's, de tweede in dat van konijnenembryo's en in de cellen van melanosarcomen. Een vermeerdering van nucleolussubstantie in de kern gedurende het pigmentatieproces, een uitstooting dezer massa in het protoplasma en een omzetting er van in pigmentkorrels kon VON SZILY niet vaststellen.

Ook MIESCHER (1923) heeft de ontwikkeling van het pigment nagegaan in de retina van embryo's van kippen en konijnen, en ofschoon dezelfde beelden werden verkregen als door VON SZILY beschreven zijn, meent hij er een andere verklaring aan te moeten

toekennen. Evenals VON SZILY zag ook MIESCHER als voorstadia der bruine pigmentkorrels lichaampjes, welke kernkleurstoffen (b.v. haematoxyline) tot zich trekken, en wat hun uiterlijk betreft volkomen op de bruine pigmentkorrels gelijken. Ook werden overgangen tusschen deze basophiele lichaampjes en pigmentkorrels of -staafjes waargenomen; soms is de eene helft van zoo'n lichaampje basophiel, terwijl de andere reeds een lichtbruine kleur heeft aangenomen. Op grond van verschillende overwegingen meent deze onderzoeker echter een identiteit der zich met haematoxyline kleurende korrels met chromatinedeeltjes te moeten uitsluiten. Zoo werden wel is waar korrels tegen de kern aanliggend gezien, een uittreden van chromatine uit de kern kon echter nooit worden aangetoond. Bovendien komen de korrels volstrekt niet uitsluitend in de omgeving der kern, doch over het geheele celplasma verspreid voor, terwijl de bruine pigmentkorrels en -staafjes meer in het naar de chorioïdea gekeerde gedeelte der cel worden aangetroffen. Zoowel de pigmentkorrels als de zich met heamatoxyline kleurende lichaampjes trekken bij methylgroen-pyroninekleuring de laatste kleurstof sterk tot zich. Worden de pigmentkorrels met waterstofsuperoxyde gedeeltelijk gebleekt, dan ziet men, na pyroninekleuring, de roode kleur nog sterker uitgesproken. Na volledige bleeking in het door ALFIERI aangegegeven mengsel van kaliumchloraat en zoutzuur opgelost in 96 % alcohol, is echter het kleurlooze pigmentsubstraat nòch met pyronine, nòch met haematoxyline, aantoonbaar. Op grond hiervan meent MIESCHER, dat de chromophilie ten opzichte van haematoxyline of pyronine niet door het propigment, het kleurlooze substraat van de latere pigmentkorrel, doch door het melanine zelf wordt veroorzaakt. Bij toename van het melaninegehalte wordt de kleurstof door de donkere kleur van het melanine geheel of gedeeltelijk verborgen. Deze meening vond in de volgende proef een sterken steun: Bindweefsel kleurt zich met methylgroen-pyronine bleekrood. Wordt het weefsel nu eenige uren in een ammoniakale oplossing van melanine (welke kunstmatig uit het dioxyphenylallanine werd bereid) gedrenkt, waardoor het een zwakbruine kleur aanneemt, en past men dan de methylgroen-pyroninekleuring toe, dan is het bindweefsel thans intensief rood gekleurd. Behalve met haematoxyline en pyronine kleurt het melanine zich ook met

safranine, methyleenblauw, kresylviolet en andere kernkleurstoffen.

Van een vermeerdering der nucleolussubstantie in de kern, en van een uittreden van nucleoli of andere kernbestanddeelen in het protoplasma kon MIESCHER niets waarnemen.

Eigen onderzoek.

Onderzocht werden stukjes huid van embryo's van muizen en ratten; het pigmentepitheel in de retina van pasgeboren muizen; het pigmentepitheel in de retina van kippenembryo's, welke gedurende 3½ en 4½ dag en van eendenembryo's, welke 4 dagen waren bebroed. De fixatie geschiedde in sublimaat, vloeistof van BOUIN en vloeistof van ZENKER.

In het pigmentepitheel van de retina der vogelembryo's kan men het allereerste begin der pigmentvorming duidelijk waarnemen. Slechts enkele korreltjes en staafjes komen in de cellen voor, waaraan een meer of minder bruine kleur van het melanine is te herkennen. De met eosine en haematoxyline behandelde praeparaten vertoonen naast bruingetinte staafjes andere, welke zich zwak met haematoxyline hebben gekleurd. Worden de praeparaten door een verblijf van eenige uren in diaphanol gedepigmenteerd, dan ziet men na haematoxylinekleuring alleen aan de celkernen een blauwe kleur; van staafjes of korrels in het protoplasma liggend, welke het haematoxyline tot zich hebben getrokken, is niets meer te bespeuren. Hetzelfde resultaat werd verkregen met het gepigmenteerde retinaepitheel in het oog van een pasgeboren muis. Men ziet, hoe hier het pigment reeds volledig ontwikkeld is; kleuring met haematoxyline doet de korrels bruin tot zwart blijven, zonder dat van een opnemen van kleurstof iets is te bespeuren. Na totale depigmentatie in diaphanol (de praeparaten blijven ± 24 uur in deze vloeistof) is van de aanwezigheid van bruin gekleurde of door haematoxyline blauw gekleurde korrels niets te bespeuren. Na gedeeltelijke depigmentatie (de praeparaten blijven dan 5—10 uur in het diaphanol) ziet men aan eenige korrels een zwak blauwe kleur na haematoxylinekleuring optreden.

Toepassing der nuclealreactie heeft nergens, behalve in de celkernen, het voorkomen van positief reageerende stoffen doen

kennen. Nòch in de retina der vogelembryo's, waar duidelijk zich met haematoxyline kleurende staafjes aanwezig zijn, nòch in de gedeeltelijke of volledige, in diaphanol gedepigmenteerde, retina van een pasgeboren muis, werd een positieve reactie van lichaampjes buiten de kern waargenomen. Evenmin waren aan de kernen veranderingen te zien, die op een uitstooting van nucleolussubstantie naar het protoplasma wezen. Een vermeerdering van nucleolussubstantie in de kern gedurende het pigmentatieproces kon niet worden vastgesteld.

Met behulp van bepaalde zilverkleuringen is het mogelijk de voorstadia van pigmentkorrels aan te toonen, welke onder de zilverbehandeling, evenals de reeds gevormde melaninekorrels, als zwarte lichaampjes zichtbaar worden. Door verschillende onderzoekers worden deze lichaampjes propigmentkorrels genoemd, zonder dat daarmee iets naders omtrent de chemische geaardheid van deze structuren gezegd zou zijn.

Voor de bestudeering van dit propigment werden stukjes huid van muizen- en rattenembryo's in de vloeistof van BOUIN gefixeerd en op de paraffine coupes de zilverkleuring van MASSON (1913) toegepast. De coupes worden daartoe goed in aq. dest. gespoeld en komen nu gedurende 24 uur in de vloeistof van FONTANA. Deze wordt op de volgende wijze bereid: Bij een 5 % zilvernitraatoplossing wordt zoolang ammoniak toegevoegd tot het neerslag weer oplost. Dan wordt de zilvernitraatoplossing er weer bijgedruppeld tot een opalesceerende vloeistof is ontstaan. Men laat dit neerslag bezinken en gebruikt nu de bovenstaande vloeistof. De coupes moeten in deze vloeistof in het donker verblijf houden. Dan worden ze uitgespoeld en gedurende 10 minuten in het volgende mengsel gebeitst:

2 % ammoniumrhodanaat	17 c.c.
aq. dest.	83 c.c.
1 % goudchloride	eenige druppels.

Dit mengsel kan langen tijd bewaard worden.

Na beitsing komen de coupes gedurende enkele seconden tot 1 minuut in een 5 % natriumhyposulfietoplossing. Vervolgens wordt goed uitgespoeld en nagekleurd met brasiline of aluinkar-

mijn. Een vereischte voor het gelukken der methode is het gebruik van schoon glaswerk.

Zoowel het propigment als het melaninepigment zelf zijn na deze behandeling als zwarte korrels te herkennen. Vergelijkt men de donker gekleurde korrels in zilverpraeparaten met die in praeparaten, welke met haematoxyline en eosine zijn gekleurd, dan valt het veel grootere aantal in de eersten onmiddellijk in het oog. Ook hier leidt toepassing der nuclealreactie tot negatieve uitkomsten. Dus ook het met zilver aantoonbare propigment bevat geen op thymonucleïnezuur gelijkende stoffen, en kan daarmee dus niet als afkomstig van het kernchromatine worden aangeduid.

H. De basophiele korrels in mestcellen.

Onderzoekingen van Paul Ehrlich (1877), welke door zijn leerling Westphal (1880) werden voortgezet, leerden, dat in het bindweefsel cellen voorkomen, die in haar protoplasma grove korrels vertoonen, welke een sterke affiniteit tot basische anilinekleurstoffen bezitten en zich met sommige er van metachromatisch kleuren. Door Ehrlich werden ze korrelcellen („granulierte Zellen") genoemd, of ook wel mestcellen („Mastzellen"), omdat zij zich vooral daar bevonden, waar een rijkelijke voeding van het weefsel mocht worden verondersteld (zoo bij pathologische toestanden als ontsteking, e.d.). Ehrlich en Westphal troffen mestcellen aan in het bindweefsel en in het bloed van den mensch en van verschillende dieren, zoowel onder normale als pathologische omstandigheden, in menschenbloed zouden ze echter alleen onder abnormale omstandigheden voorkomen. Later heeft Canon (1892) mestcellen ook in het bloed van gezonde personen regelmatig gevonden.

Door Ehrlich, Westphal, Calleja (1896), Marchand (1898) werden de in het bindweefsel voorkomende mestcellen beschouwd als bindweefselcellen, die op bijzondere wijze veranderd zijn, waarbij niet zou zijn uit te maken, of deze verandering in degeneratieven, of anderen zin moet worden opgevat. Over de verhouding, waarin de mestcellen uit het bindweefsel tot die uit het bloed staan, zijn de meeningen nog zeer verdeeld. Terwijl Kanthak en Hardy (1894), Gulland (1906), Helly (1906)

slechts één soort mestcel aannemen, gelooven EHRLICH, MAXIMOW (1906), WEIDENREICH (1908), NAEGELI (1922), dat de mestcellen uit het bloed geheel verschilllend zijn van die van het bindweefsel; niet alleen in histologischen, doch ook in histogenetischen zin. Wat de eersten aangaat, zij zouden zich door andere kleurbaarheid, verschil in oplosbaarheid der granula in water en vooral door haar polymorphe kern van de laatsten onderscheiden. De mestcellen uit het bloed zouden volgens MAXIMOW, NAEGELI e.a. als echte gekorrelde leucocyten moeten worden opgevat; histogenetisch stammen zij van de basophiel gekorrelde myelocyten en deze weer van de myeloblasten af. Daar tegenover staat de meening van WEIDENREICH, die de basophiele leucocyten bij den mensch als gedegenereerde lymphocyten beschouwt, terwijl deze bloedlichaampjes bij caviae werkelijke mestleucocyten zouden zijn.

In 1890 had RANVIER voor het eerst in de aponeurosis femoralis bij den kikker en daarna in het bindweefsel van andere amphibia en zoogdieren een celvorm waargenomen, welke zich kenmerkte door een spoelvormig cellichaam, dat meestal voorzien was van sterk vertakte uitloopers, terwijl zich in het protoplasma talrijke korrels bevonden, Gedeelten van deze uitloopers konden door de cel worden afgesnoerd. Aangezien RANVIER de laatste eigenschap voor specifiek hield, werden de cellen *clasmatocyten* genoemd. De clasmatocyten zouden van leucocyten afstammen, welke uit de circulatie waren getreden; in het bindweefsel terecht gekomen, zouden zij zich daar onder sterke volumentoename tot de, zich niet meer van haar plaats bewegende, clasmatocyten veranderen. Deze cellen dienen wel onderscheiden te worden van de mestcellen. De laatsten zijn volgens RANVIER een variëteit van de clasmatocyten. Beiden stammen van leucocyten af, zooals voor de mestcellen experimenteel in de peritoneaalvloeistof van urodelen en ratten kon worden aangetoond; ook de mestcellen vertoonen clasmatose. Mestcellen zijn dus clasmatocyten, doch het omgekeerde is niet het geval. Terwijl de mestcellen rond of onregelmatig gevormd zijn, vertoonen de clasmatocyten den spoelvorm met de sterk vertakte uitloopers. Bij de rat komen beide vormen naast elkaar in het bindweefsel voor; bij het konijn en de cavia alleen de laatste. Door MARCHAND

(1898) echter werden eenige jaren later de clasmatocyten van RANVIER geïdentificeerd met bindweefselcellen uit de adventitia der vaten.

Een groote reeks van onderzoekers heeft zich daarna met het mestcel- en clasmatocytenvraagstuk beziggehouden, zonder dat op het oogenblik nog een bevredigende oplossing gegeven is. Een der voornaamste onder hen is MAXIMOW (1906) geweest. Volgens dezen kunnen de bij amphibia en zoogdieren voorkomende clasmatocyten niet met elkaar geïdentificeerd worden. Terwijl de eersten als typische mestcellen te beschouwen zijn, die alleen maar een bijzonderen vorm hebben aangenomen, moeten de tweeden als een afzonderlijke celsoort worden opgevat, waarvan een clasmatose onder normale omstandigheden niet valt waar te nemen. Het is volgens dezen onderzoeker dan ook beter den naam clasmatocyten in het geheel te laten vervallen en te spreken van „mestcellen" bij amphibia en „ruhende Wanderzellen" bij zoogdieren.

Tegen de meening, dat clasmatose niet zou bestaan, heeft zich in den laatsten tijd MARCHAND (1922) gekant; hiertegenover staat weer, dat LEHNER (1924) meent de clasmatose als een kunstproduct te moeten opvatten, teweeggebracht door het uitpraepareeren van het weefsel.

Van meer belang dan de kerkomst der basophiel gekorrelde cellen zal voor ons de herkomst der korrels zelf zijn.

Door enkele andere onderzoekers werd aan een verband tusschen mestcellen en vetcellen gedacht, en daarmee de mestcelkorrels met vetdruppels geïdentificeerd. Terwijl HEITZMANN aannam, dat mestcellen in vetcellen konden overgaan, werden de mestcellen door POLJAKOFF (1888) als atrophische vetcellen beschouwd. Door verschillende onderzoekers werd het gelijktijdig voorkomen van lipoïeddruppels in mestcellen waargenomen. Zoo vermeldt o.a. HUGUENIN (1912), dat in een geval van status thymico-lymphaticus in mestcellen lipoïeddruppels werden aangetroffen, welke zich wel met soedan en osmiumzuur, echter niet met nijlblauwsulfaat kleurden. Volgens CIACCIO (1913) zouden alleen bij pathologische toestanden in mestcellen lipoïeden ontstaan. Deze „mestlipoïedcellen", welke nog al eens in vet-

weefsel werden aangetroffen, zouden bij de gewone behandeling kenbaar zijn aan de vacuolen, welke zich in het celplasma bevinden, ontstaan door oplossing van het lipoïed.

Reeds door EHRLICH (1877) werd de mogelijkheid eener gelijkstelling van mestcelkorrels met vetachtige stoffen van de hand gewezen; volgens dezen onderzoeker zouden de korrels uit eiwitten zijn opgebouwd. Door RAUDNITZ (1883) werden de mestcelgranula als slijmkorrels opgevat en daarmee de mestcellen als slijmig gedegenereerde cellen beschouwd. Een aanhanger vond deze theorie in HOYER (1890); van de twee eigenschappen, waardoor het slijm gekenmerkt wordt, het vermogen tot opzwellen en de kleurbaarheid met thionine in de metachromatische kleur, zouden de mestcelkorrels alleen de laatste bezitten. LEHNER (1924) toonde echter later aan, dat ook de korrels in mestcellen het vermogen tot opzwellen bezitten.

Vooral onderzoekingen van SCHWENTER TRACHSLER (1908) hebben uitgemaakt, dat de opvatting van RAUDNITZ, de mestcelgranula als slijmkorrels op te vatten, onjuist is. Zoo kleuren zich b.v. de korrels in mestcellen niet met mucikarmijn, daarentegen kleuren zij zich wel met het toluïdineblauw volgens LUNDVALL, dat het slijm weer ongekleurd laat.

RENAUT (1893) ontdekte bepaalde overeenkomsten in gedrag tegenover kleurstoffen tusschen kollagene fibrillen uit het bindweefsel en clasmatocytenkorrels en meende, dat de laatsten tot taak zouden hebben het kollageen te vormen. Ook met het amyloïed zouden zij punten van overeenkomst bezitten. Daartegenover staat, dat reeds NORDMANN (1885) op verschillen tusschen amyloïed en mestcelkorrels had gewezen. Uit de kleurbaarheid met orceïne meende LÖWENTHAL (1903) op een verband tusschen mestcellen en ontstaan van elastische vezels te mogen wijzen. Toch pleit hiertegen sterk het voorkomen van mestcellen onafhankelijk van elastische vezels. Het is bekend, dat juist de arteriënwanden arm zijn aan mestcellen; in de intima of media worden zij slechts bij hooge uitzondering aangetroffen.

Door HARRIS en SCHUBERG (1903) werd aangenomen, dat mestcellen de slijmachtige bestanddeelen, welke in de intercellulaire bindweefselmassa voorkomen, zouden vormen. Uit het verschijnsel, dat een zure toluïdineblauwoplossing slechts mest-

celgranula en de grondstof uit het kraakbeen kleurt, meende SCHAFFER (1907) te mogen opmaken, dat de eersten uit chondroïtinezwavelzuur bestaan, en bij de vorming van kraakbeen een rol spelen. DUBREUIL (1913) kon in mestcellen mitochondriën aantoonen; TSCHASCHIN (1914) meende, dat deze mitochondriën verbruikt worden bij de vorming der korrels. ARNOLD (1914) beschouwt de mestcelkorrels als secreetgranula, ontstaan uit chondriosomen.

Terwijl deze meeningen omtrent den aard en het ontstaan der korrels in mestcellen geen rol toekennen aan de celkern, bestaan er ook andere, volgens welke zij uit de laatste zouden zijn gevormd. Zoo neemt WEIDENREICH (1908) voor de basophiele leucocyten bij den mensch aan, dat de korrels hierin ontstaan zijn door afsnoering uit de kern en vervolgens uit het protoplasma nog enkele stoffen voor hun opbouw noodig hebben. RUZICKA (1894; 1906) zou in levende leucocyten het afsnoeren van deeltjes van de kern hebben waargenomen. Of dit ook, of uitsluitend, voor basophiele leucocyten geldt, wordt niet vermeld. DOWNEY (1913) meent, dat de kernbestanddeelen in opgelosten toestand door de kernmembraan naar het protoplasma der mestcellen diffundeeren en daar tot de basophiele korrels worden.

STAFFEL, RHEINDORF (1905) en MEIROWSKY meenen een ontstaan van mestcelgranula uit de kern en een overgang dezer granula in pigmentkorrels te hebben waargenomen. Door PHILIPSON (1890) was trouwens reeds gewezen op het gezamenlijk voorkomen van pigmentcellen met mestcellen. MEIROWSKY bestraalde gedeelten van de huid van menschen met de kunstmatige hoogtezon en exstirpeerde dan na bepaalde tijden stukjes huid, waarop een microscopisch onderzoek werd verricht. In deze praeparaten kon een toename van mestcellen, een ontstaan van mestcelgranula uit de kern en een overgang dezer granula tot pigmentkorrels worden waargenomen.

De MOULIN (1923) tracht op de volgende wijze aan te toonen, dat de celkern een rol speelt bij de vorming van basophiele korrels. Bij een konijn werd intraveneus een zekere hoeveelheid physiologische keukenzoutoplossing ingespoten, en nu werden op verschillende tijden uitstrijkpraeparaten gemaakt en volgens GIEMSA gekleurd. Eén uur na injectie zijn de kernen van verschillende

lymphocyten en leukocyten wat gezwollen en homogeen blauw gekleurd, terwijl om de kern heen uiterst fijne chromatinekorrels liggen. Na twee uur zijn de korrels duidelijker te herkennen, doordat zij in grootte en kleurbaarheid zijn toegenomen; na vier uur zijn de korrels nog grooter geworden. Zeven uur na de injectie is in verschillende bloedlichaampjes het beeld der basophiele mestcelkorreling duidelijk te herkennen; deze leucocyten zijn nu niet meer van de normaal voorkomende mestcellen te onderscheiden.

Van belang voor de opvatting van DE MOULIN zijn wellicht de waarnemingen, welke LEHNER (1924) op levende mestcellen verrichtte. Werd een gedeelte van het mesenterium van zoogdieren levend onder den microscoop bestudeerd, zonder dat echter van een verwarmbare objecttafel werd gebruik gemaakt, dan waren de aanwezige mestcellen aan haar sterk lichtbrekende korrels duidelijk te herkennen. Werd het weefsel echter gedurende het onderzoek op lichaamstemperatuur gehouden, dan waren de meeste korrels der mestcellen moeilijk te onderscheiden. Slechts enkelen vertoonden een duidelijk waar te nemen lichtbrekingsverschil met het overige protoplasma. Wordt het onderzoek gedurende eenigen tijd voortgezet, dan ziet men het beeld der korrels hoe langer hoe meer op den voorgrond treden, terwijl de celkern, die eerste tegen het niet of weinig gegranuleerde plasma duidelijk afstak, nu moeilijker wordt te herkennen. Toevoeging van 10 % azijnzuur aan het weefsel doet de korrels onmiddellijk tevoorschijn treden; de kernen daarentegen zijn na deze zuurtoevoeging veel moeilijker te herkennen. Deze beelden verklaart LEHNER door aan te nemen, dat bij het afsterven der cel de lichtbreking der korrels op voorloopig nog niet afdoende te verklaren wijze toeneemt, waardoor het verschil in lichtbreking tusschen kern en plasma geringer wordt. De kern wordt dus slechts moeilijker te herkennen door de toename in lichtbreking van het protoplasma, zonder dat men daarbij een uittreden van stoffen uit de kern behoeft aan te nemen. Een deelnemen van de kern aan de vorming der mestcelgranula kon LEHNER nòch in embryonale, nòch in volwassen, weefsels aantreffen. Evenmin konden pigmentkorrels in mestcellen worden aangetoond.

Door Mej. Dr. VAN HERWERDEN (1914) werd gevonden, dat

nuclease onwerkzaam is op de mestcelkorrels. In het onderhuidsche bindweefsel van de muis, dat in alcohol gefixeerd was, konden, nadat het gedurende drie dagen aan de inwerking van een nucleasehoudende vloeistof was blootgesteld, de granula in de mestcellen nog op de gewone wijze worden aangetoond.

Eigen onderzoek.

Naast een groot aantal uitstrijkpraeparaten van bloed van menschen, konijnen, katten, ratten, muizen en kikkers, werd het losmazige bindweefsel, voorkomend in den oesophagus van kikkers, en het bindweefsel van blaas en vagina van ratten en muizen onderzocht. De organen werden gefixeerd in absoluten alcohol, sublimaat, vloeistof van ORTH en vloeistof van KINGSBURY. De kleuring der mestcelkorrels geschiedde met de polychrome methyleenblauwmethode volgens UNNA. De praeparaten werden daartoe 10 minuten met het polychrome methyleenblauw gekleurd en vervolgens gedifferentiëerd in het glycerine-aethermengsel van UNNA (als zoodanig bij de firma GRÜBLER verkrijgbaar). Na fixatie in het mengsel van KINGSBURY ziet men, dat de mestcelkorrels ook op mitochondriënkleuringen reageeren. Zoowel met het ijzerhaematoxyline van HEIDENHAIN, als volgens de methode van KOPSCH, vertoont het protoplasma der mestcellen zwart of rood gekleurde korrels.

De toepassing der nuclealmethode heeft de volgende resultaten opgeleverd:

1°. In sommige mestcellen ziet men, dat sommige korrels een positieve reactie vertoonen. Dat niet alle in de cel aanwezige korrels positief gereageerd hebben, leeren vergelijkingen van coupes van hetzelfde orgaan, welke volgens UNNA en volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandeld zijn.

2°. In een coupe is het aantal korrels, dat het fuchsinezwaveligzuur gekleurd heeft, niet gelijkmatig verdeeld. Soms kan men in een praeparaat nog al wat mestcellen met violette korrels aantreffen, waarvan er dan veelal eenige bij elkaar liggen, terwijl in een andere coupe van hetzelfde weefsel slechts met moeite hier en daar paarse granula zijn te herkennen.

3°. In die coupes, waar slechts weinig positief reageerende mestcelkorrels zijn te herkennen, wordt meestal een diffuse

licht-violette kleuring van het geheele weefsel waargenomen.

4°. Veranderingen in den duur en de temperatuur der hydrolyse brengen geen wijziging in het resultaat der kleuring te weeg, tenzij langdurig wordt gehydrolyseerd (zie sub. 8).

5°. Wordt de hydrolyse achterwege gelaten, dan treft men ook thans positief reageerende korrels aan. Vergelijkingen met andere, gehydrolyseerde, praeparaten toonen, dat het aantal dezer korrels niet is toe- of afgenomen.

6°. Praeparaten, welke eerst gehydrolyseerd zijn, daarna zorgvuldig worden uitgespoeld en vervolgens met polychrome methyleenblauwoplossing worden gekleurd, vertoonen geen verschil in aantal mestcellen en aantal mestcelkorrels vergeleken met praeparaten, welke direct volgens UNNA zijn gekleurd.

7°. De verschillende fixatieven oefenen geen invloed uit op den uitslag der nuclealkleuring, wat betreft aantal en kleurbaarheid der mestcelkorrels.

8°. Wanneer men langdurige hydrolyse toepast (± 10 minuten), dan valt op te merken, dat het aantal der positief reageerende korrels in de praeparaten aanmerkelijk vermindert. Men ziet in die gevallen echter dikwijls, dat het omgevende weefsel zich lichtviolet heeft gekleurd, of dat die kleur, indien zij reeds aanwezig was, in sterkte is toegenomen. Zeer leerrijk is de volgende proef: Indien men twee op elkaar volgende coupes van een orgaan volgens de methode van FEULGEN en ROSSENBECK behandelt, dan ziet men hoe in beiden wel eens een plek voorkomt, waarin een aantal mestcellen met positief reageerende korrels bij elkaar liggen. Wordt nu van twee op elkaar volgende coupes de eene op de gewone wijze gehydrolyseerd, de andere echter gedurende een langer tijdsverloop aan de inwerking van het zoutzuur blootgesteld, en vergelijkt men daarna beide praeparaten onder het microscoop, dan ziet men, dat terwijl in het eerste een plekje voorkomt, waar eenige mestcelgranula zijn te herkennen, de tweede op dezelfde plaats een diffuse kleuring van het omgevende weefsel vertoont.

9°. In de onderzochte uitstrijkpraeparaten van het bloed kon in het protoplasma van geen enkele leucocyt het voorkomen van zich met zwaveligzure fuchsine kleurende korrels worden waargenomen.

In fig. 18 ziet men bij *a.* een clasmatocyt in het bindweefsel van een kikkeroesophagus, waarin de zich met het zwaveligzure fuchsine gekleurd hebbende korrels, zoowel in het eigenlijke cellichaam, als in de uitloopers zijn te herkennen.

Overziet men de verkregen resultaten, dan blijkt dus, dat in het protoplasma der mestcellen een stof kan voorkomen, gebonden aan korrels, welke in staat is het zwaveligzure fuchsine te kleuren. Legt men zich de vraag voor, of deze stof identiek of nauw verwant is met het thymonucleïnezuur, dan meen ik haar, op grond van de volgende overwegingen, ontkennend te moeten beantwoorden:

a. Zonder voorafgaande hydrolyse valt de reactie van FEULGEN en ROSSENBECK eveneens positief uit.

b. Langdurige hydrolyse gaat wel is waar gepaard met het verdwijnen der positief reageerende korrels, doch hiervoor in de plaats treedt een kleuring van het omgevende weefsel op. Blijkbaar is hier dus de positief reageerende substantie niet afgebroken tot een stof, welke de reactie niet meer vertoont, doch haar adsorptie aan de mestcelkorrels is opgeheven, en de nog steeds positief reageerende massa heeft zich aan een ander weefselbestanddeel gebonden. Klaarblijkelijk is dus bij de hydrolyse niet de positief reageerende substantie vernietigd, doch slechts de adsorptie aan de mestcelgranula is opgeheven. Een dergelijke uitkomst werd bij nucleïnezuurhoudende bestanddeelen nooit verkregen. Langdurige hydrolyse gaat hier gepaard met vermindering in hoeveelheid nucleal, zonder dat het nucleal naar andere weefselbestanddeelen diffundeert.

Over den vermoedelijken aard van de stof, die aan de mestcelgranula is gebonden, wordt gesproken in hoofdstuk VI.

c. Een betrekking tusschen positief reageerende mestcelgranula en celkern kon niet worden aangetoond. De granula komen volstrekt niet alleen in een zône rondom de kern voor, doch zijn even talrijk in de uitloopers vertegenwoordigd (men zie fig. 18). Een uitstooting van chromatinedeeltjes uit de kern werd nooit waargenomen.

Men ziet dus in het microscopische praeparaat, dat de positief

met zwaveligzure fuchsine reageerende stof in mestcellen nu eens aan korrels is gebonden, dan weer uit de cel naar de omgeving is gediffundeerd. Of dit op een vastere of lossere binding aan de mestcelgranula gedurende het leven zou wijzen, of slechts op een meer of minder snel indringen der fixatievloeistof berust, waardoor de substantie in het laatste geval tijd heeft om uit de cel te diffundeeren, moet voorloopig nog onopgelost blijven.

Het voorkomen van pigmentkorrels in mestcellen kon ik in mijn praeparaten niet vaststellen. Wellicht kunnen onderzoekingen van BETANCÈS (1922, 1926) een verklaring geven voor de uitkomsten, welke MEIROWSKY en STAFFEL meenen te hebben verkregen. Eerstgenoemde onderzoeker vond in mestcellen, en later ook in eosinophile leucocyten, bij panoptische kleuring donker gekleurde korrels. Deze korrels zijn door hem necrotische of melanoïede granula genoemd („granulations nécrotiques ou mélanoïdes"). Zij zouden als gedegenereerde korrels moeten worden opgevat. De donkere tint zou daardoor worden veroorzaakt, dat de korrels zich behalve met eosine ook nog met basische blauwe kleurstoffen kleuren. In ongekleurde praeparaten waren zij n.l. niet van de andere korrels te onderscheiden. Het is niet onmogelijk, dat de onderzoekers, welke meenen het voorkomen van melanine-pigmentkorrels in mestcellen te hebben aangetoond, deze necrotische korrels van BETANCÈS hebben waargenomen.

I. Structuren voorkomende in het protoplasma van kernlooze roode bloedlichaampjes.

Het roode bloedlichaampje van mensch en zoogdier doet zich gewoonlijk voor als een biconcaaf schijfje, waarvan sommige onderzoekers meenen, dat dit een blaasje is met een haemoglobinehoudend protoplasma als inhoud, terwijl anderen het als een meer gecompliceerd gebouwd lichaam beschouwen, dat aan zijn oppervlakte haemoglobine heeft geadsorbeerd, doch waaraan in elk geval, in het natieve praeparaat, morphologisch geen verdere bijzonderheden zijn op te merken. Daarentegen komen bij verschillende min of meer pathologische toestanden structuren in het bloedlichaampje voor, waarvan door verschillende onderzoekers wordt aangenomen, dat zij iets uit te staan hebben met de vroeger in den normoblast voorkomende kern, terwijl door anderen een

verwantschap dezer structuren met de kern ontkend wordt. De structuren beschreven in het protoplasma van roode bloedlichaampjes, welke ik in de literatuur heb kunnen verzamelen, zijn de volgende:

1°. een pyknotische kern.
2°. deelen van de karyorhectisch gedegenereerde normoblastenkern.
3°. lichaampjes van HOWELL en JOLLY.
4°. lichaampjes van SCHMAUCH.
5°. chromatinestofjes (of randlichaampjes) van WEIDENREICH.
6°. „nucleoïden" van LAVDOWSKY, PETRONE, REDDINGIUS, PHIGINI, LOEWIT, e.a.
7°. paranucleairlichaampjes van BREMER.
8°. ringen van CABOT.
9°. ringen van HERZORG.
10°. polychromasie.
11°. basophiele puncteering.
12°. vitaal kleurbare netstructuren.
13°. lininenetwerk van RUZICKA.
14°. stippeling van SCHÜFFNER.
15°. vlekken van MAURER.
16°. azurophiele puncteering van NAEGELI.
17°. azurophiele vlekken van NAEGELI.
18°. vacuolen van HAYEM.

Van deze genoemde structuren zullen slechts die sub. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13 nader onder de oogen worden gezien.

Voordat echter deze structuren afzonderlijk besproken kunnen worden, is het gewenscht de wijze na te gaan, waarop de kernhoudende normoblast tot kernlooze normocyt wordt, aangezien vele theorieën over de genese dier structuren gegrondvest zijn op een bepaalde meening omtrent het totstandkomen van dit ontkerningsproces.

a. Het verdwijnen der erythroblastenkern.

De kernlooze roode bloedlichaampjes uit het periphere bloed bij zoogdieren zijn ontstaan uit kernhoudende erythroblasten. Dit geschiedt niet alleen bij het embryo, doch ook tijdens het extrauterine leven vindt dit proces, zooals NEUMANN (1881) aantoonde,

in het beenmerg plaats. De wijze, waarop de erythroblast tot erythrocyt wordt, zou volgens KOELLIKER (1889) geschieden door kernresorbtie, welke theorie in NEUMANN een groot voorstander vond. Van een tegenovergestelde meening was RINDFLEISCH (1880), volgens wien het verdwijnen der kern op een uitstooting uit het celplasma zou berusten. Hij grondde dit op het feit, dat toevoeging van een 0,6 % Na Cl-oplossing aan embryonale bloedlichaampjes uitstooting der kern tengevolge had, waarnemingen, die reeds vroeger door BIZZOZERO waren verricht. Ook bestonden onderzoekers, die een geheel andere zienswijze omtrent het ontstaan der kernlooze erythrocyten huldigden. Zoo veronderstelden MALASSEZ (1882) en RANVIER (1875), dat zij door protoplasma-afsnoering van erythroblasten ontstonden. Volgens HAYEM (1889) zouden ze uit bloedplaatjes ontstaan; vandaar de naam haematoblasten voor deze laatsten.

Onderzoekingen van vele anderen bewezen spoedig de onjuistheid dezer beide laatste opvattingen, en tegenwoordig hebben zij dan ook slechts nog een historische waarde.

Een middenweg tusschen de theorieën van NEUMANN en RINDFLEISCH werd door EHRLICH (1880) bewandeld, die zoowel een uitstooting (bij normoblasten) als een degeneratie en resorbtie der kern (bij megaloblasten) zag optreden.

De mogelijkheden, volgens welke de kernhoudende erythroblast tot kernlooze erythrocyt kan worden, zijn de volgende:

1°. de kern wordt als zoodanig uitgescheiden;
2°. de kern ondergaat in het celplasma eerst veranderingen, kan daarbij in stukken uiteenvallen en deze deelen worden dan uit de cel gestooten;
3°. de kern wordt in haar geheel geresorbeerd;
4°. eerst, nadat karyorhexis heeft plaats gehad, worden de kernbrokken geresorbeerd.

Aanhangers vond deze theorie van RINDFLEISCH in BIZZOZERO, DOMINICI (1899) en ALBRECHT (1895).

Door een buitengewoon groot aantal onderzoekers werden echter aan de erythroblastenkern zulke uitgesproken veranderingen in vorm en kleurbaarheid beschreven, dat al spoedig de meening van RINDFLEISCH als algemeen geldend beginsel voor het tot stand komen der erythrocyt in twijfel werd getrokken.

Een kleiner en homogener worden der kern en een uiteenvallen in 2—4 deeltjes was reeds door KOELLIKER beschreven. NEUMANN vermeldt het uiteenvallen der kern in talrijke deelen; ook MALASSEZ (1882) zag in de plaats van de oorspronkelijke kern verschillende stukken optreden. M. B. SCHMIDT (1891) trof pyknose der kern aan. KOSTANECKI (1892) zag een kleine, homogene, zich intensief kleurende, pyknotische kern en daarbij tegelijk een fragmentatie in 2—3 deelstukken. Soortgelijke waarnemingen werden nog verricht door VAN DER STRICHT (1895), TIMOFEJEWSKY, ISRAEL en PAPPENHEIM (1896), ASCHHEIM (1902), e.a. Insnoeringen aan de kern, die aanleiding geven tot het ontstaan van roset-, klaverblad-, of hartvormige figuren worden door vele schrijvers vermeld (BETTMANN, ASCHHEIM, JOLLY, PARDI).

HEINZ (1902) zag aan bloedlichaampjes van konijnen-embryonen de contouren der kernen hoe langer hoe vager worden, naarmate de affiniteit tot kleurstoffen een geringere werd; kernfragmentatie trad hierbij zelden op.

Op grond van deze morphologische kernveranderingen komen de mogelijkheden onder 2, 3 en 4 genoemd in aanmerking.

Zoo zag GIBSON (1886) eerst na fragmentatie de kern uit het protoplasma treden. Volgens HOWELL (1890) wordt alleen de pyknotische kern uitgestooten; bij een normale kern gebeurt dit nooit. Deze waarnemingen werden door vele anderen, zoowel aan uitstrijkpraeparaten van bloed of beenmerg, als aan orgaancoupes bevestigd; zoo o.a. door HEIDENHAIN (1907), ENGEL (1899), MAXIMOW (1899), SAXER (1896), ASCHHEIM (1902).

ELIASBERG (1893) en FREIBERG (1892) onderzochten voor hun proefschrift de vorming van roode bloedlichaampjes bij den hond na verbloedingen; deze aan het beenmerg, gene aan de milt der zelfde dieren. Beide komen daarbij tot hetzelfde resultaat: de kernlooze ontstaan uit de kernhoudende bloedlichaampjes door kernresorbtie, welke van af de peripherie naar het centrum voortschrijdt en als een vermindering in kleurbaarheid tot uiting komt.

Uitvoerig onderzochten PAPPENHEIM (1896), en ISRAEL en PAPPENHEIM (1896) de wijze, waarop de ontkerning van normoblasten tot stand komt.

Zij konden aan roode bloedlichaampjes van zoogdierembryo's allerlei overgangen aantoonen van kernen, die de kleurstof

(neutraalrood of haemaluin) intensief tot zich hadden getrokken, tot zulke, welke nauwelijks als schim waren te herkennen. Het verdwijnen der kern komt tot stand, meenen zij, doordat deze eerst pyknotisch wordt en dan het beeld der karyolyse vertoont, of doordat karyolyse direct aan de kern optreedt, hetgeen dan met karyorhexis gepaard kan gaan. Een uitstooting uit het protoplasma, zooals RINDFLEISCH dit beschreven heeft, konden PAPPENHEIM en ISRAEL nooit in hun praeparaten ontdekken. Wel vonden zij een enkele maal een geheel vrij liggende kern, doch volgens de schrijvers is dit een kern van een bloedlichaampje, waarvan het protoplasma door degeneratie verloren is gegaan, zoodat men hier niet te maken heeft met uitgestooten kernen, die in staat zijn opnieuw protoplasma te vormen en zoo tot normoblasten te worden (zooals RINDFLEISCH wil), doch met overgebleven resten van gedegenereerde bloedlichaampjes.

Ook MASSLOW (1898) vond in beenmerg en milt van jonge en volwassen zoogdieren verschillende overgangen van jonge erythroblasten met groote kern tot cellen met kleine, zich sterk kleurende, homogene (pyknotische) kern. Deze valt in twee, drie, of meer stukken uiteen, welke dan in het protoplasma worden opgelost. Als resten van deze kern zag MASSLOW soms kleine puntvormige, zich sterk met haematoxyline kleurende, lichaampjes en zich met haematoxyline aschgrauw kleurende vlekjes van verschillende grootte in het protoplasma der erythrocyten.

Door MAXIMOW (1899) zijn de proeven van ISRAEL en PAPPENHEIM herhaald, evenwel met andere uitkomst. In de pyknotische kern zag deze onderzoeker lichtere, vacuolenachtige plekken ontstaan, terwijl zich van de kern stukken afsnoerden, die eerst los in het protoplasma kwamen te liggen en dan uitgestooten werden. Een vermindering in kleurbaarheid, die ten slotte tot het ontstaan van kernschimmen aanleiding gaf, kon MAXIMOW niet waarnemen. Hij meent integendeel in sommige praeparaten duidelijk erythroblasten gezien te hebben, gefixeerd op het oogenblik, dat de kern juist het cellichaam verlaat.

Zoo kon ook ASCHHEIM (1902) bij de muis wel een uiteenvallen der erythroblastenkern in stukken van verschillende grootte zien optreden, doch van een resorbtie dezer kernbrokken in het

celplasma was niets te bespeuren. Deze kernbrokken werden in groote getale buiten de erythrocyten waargenomen, zoowel in het plasma van het circuleerende bloed, als in milt en beenmerg; in deze organen werd een phagocytose der deeltjes dikwijls opgemerkt.

Volgens Osler (1886) zou de normoblastenkern niet uitgestooten worden, ook niet in de cel in eenige brokstukken, doch in een groot aantal fijne korreltjes uiteenvallen.

Door Hammerschlag (1921) zijn uitvoerig de morphologische veranderingen bestudeerd, welke aan de kern, bij het ouder worden van den normoblast, plaats grijpen. Bij deze onderzoekingen bleek, dat in tegenstelling met de algemeen geldende opvatting, volgens welke de kernmembraan bij de veranderingen, die de kern ondergaat, intact zou blijven, de veranderingen aan de kern bij de verdere ontwikkeling van den normoblast juist gepaard gaan met een defect der kernmembraan, waardoor een vermenging van kerninhoud met protoplasma tot stand komt.

Na deze uiteenzetting over het verdwijnen der normoblastenkern bij den overgang tot erythrocyt kunnen achtereenvolgens de reeds genoemde structuren behandeld worden, welke men onder bepaalde omstandigheden in het protoplasma van het roode bloedlichaampje aantreft.

b. *De lichaampjes van* Howell *en* Jolly.

In 1890 beschreef Howell het voorkomen in de circulatie van anaemisch gemaakte katten, van roode bloedlichaampjes, welke nog een gedeelte van de oorspronkelijke normoblastenkern in den vorm van een klein lichaampje zouden bezitten. Onder normale omstandigheden wordt de normoblastenkern in het beenmerg in haar geheel uit de cel gestooten; bij de sterke aanmaak van bloedlichaampjes, welke bij anaemie plaats heeft, zou dit uitstooten der kernen te snel geschieden, zoodat een gedeelte er van in de, in het periphere bloed komende, erythrocyt achterblijft.

Ook onder normale omstandigheden zou echter in het kattenbloed een enkele maal een erythrocyt zijn te vinden, welke door

het bezit van de kernrest gekenmerkt is. Voor het ontstaan hiervan zou dezelfde verklaring gelden als voor de bij anaemie optredende lichaampjes.

JOLLY (1905) kon de waarnemingen van HOWELL bevestigen. Bij pasgeboren katten werden zoowel in de haemopoëtische organen als in het periphere bloed lichaampjes in erythrocyten aangetroffen, welke als resten van de normoblastenkern moeten worden opgevat. Naar deze beide onderzoekers worden deze lichaampjes, die onder pathologische omstandigheden, vooral na miltwegname, ook bij den mensch zouden optreden, lichaampjes van HOWELL en JOLLY genoemd.

c. *Lichaampjes van* SCHMAUCH.

Zonder met de onderzoekingen van HOWELL bekend te zijn kwam SCHMAUCH (1899) een negental jaren later, naar aanleiding van een onderzoek over de haemolytische werking van een extract van botriocephalus in physiologische keukenzoutoplossing, tot de ontdekking van kleine lichaampjes in erythrocyten van katten. Vooral in uitgeloogde bloedlichaampjes waren deze structuren duidelijk zichtbaar, zoowel bij normale katten, doch vooral bij anaemisch gemaakte dieren kwamen dergelijke erythrocyten soms in groote getale in de circulatie voor; met een 1% oplossing van methylviolet in vloeistof van RINGER zouden deze structuren zich duidelijk kleuren. Zij kunnen zoowel centraal als aan den rand van het bloedlichaampje voorkomen. Hun grootte loopt nog al eens uiteen; naast kleine puntvormige, nauwelijks te herkennen, lichaampjes komen groote ronde of onregelmatig gevormde voor, benevens allerlei overgangsstadia tusschen deze beiden. De grootere lichaampjes bezitten meestal een onregelmatigen vorm, d.i. aan een dikker, centraal gedeelte hechten zich meer of minder sterk ontwikkelde uitsteeksels vast. Vele van deze structuren vertoonen onder het microscoop een eigen beweging, en wel komt naast een snelle roteerende beweging ook een langzamere verandering van plaats voor, waarbij het lichaampje zich van de peripherie naar het centrum en vervolgens in omgekeerde richting beweegt. Vooral de onregelmatig gevormde lichaampjes, welke van uitloopers voorzien zijn, zouden deze verandering van plaats vertoonen.

Deze lichaampjes kleuren zich in gefixeerde erythrocyten (hittefixatie bij 120° C.) met methyleenblauw van LOEFFLER of elke andere kernkleurstof, mits een niet al te sterke kleuring van het haemoglobine heeft plaats gevonden.

Wat de aard dezer structuren betreft, zoo komt SCHMAUCH, na eerst allerlei andere mogelijkheden zorgvuldig overwogen te hebben (haemoparasieten, granula van ERB, necrobiose volgens MARAGLIANO), tot de conclusie, dat zij resten van de normoblastenkern voorstellen.

Volgens SCHMAUCH valt bij de rijping van den normoblast tot erythrocyt bij de kat de normoblastenkern niet in eenige deelen uiteen, zooals o.a. door ISRAEL en PAPPENHEIM wordt aangenomen, doch er zouden chemische veranderingen aan de kern optreden, waardoor het chromatine langzamerhand in het haemoglobinehoudend gedeelte zou overgaan. De genoemde structuur is dan als laatste restje van de kern bij dit uitloogingsproces op te vatten.

d. Chromatinestofjes of randkorrels.

Behalve de lichaampjes van HOWELL en JOLLY of van SCHMAUCH kunnen in het protoplasma der erythrocyten nog kleine structuren voorkomen, meestal excentrisch gelegen, welke door WEIDENREICH (1907) als laatste restje van de celkern worden verklaard en daarom chromatinestofjes worden genoemd. Deze korrels zouden zich, wat hun chromophilie betreft, geheel op dezelfde wijze gedragen als de ooispronkelijke kern, waarvan zij stammen. Ook JOLLY (1905) meent, bij een onderzoek over het verdwijnen der normoblastenkern, de kleine korrels als een overblijfsel van de celkern te moeten opvatten. NAEGELI (1923) kan zich eveneens met de opvatting omtrent een herkomst dezer lichaampjes uit de kern vereenigen.

De opvatting, dat de lichaampjes van HOWELL en JOLLY als resten van de kern zijn te beschouwen, is in twijfel getrokken door CASTRONUOVO, die deze lichaampjes in normoblasten met volkomen normale kern bij zoogdieren kon aantoonen, en deze vondst later uitstrekte tot de kernhoudende roode bloedlichaampjes van vogels. Door hem worden zij daarom niet beschouwd als een rest van de gedegenereerde, doch als een secretieproduct van de nor-

male kern. Ook KNOLL (1925) meent te hebben kunnen aantoonen, dat deze lichaampjes met ontaarde kernen niets uit te staan hebben. Steunend op het feit, dat na miltwegneming de lichaampjes in groote getale voorkomen, maakte hij de gevolgtrekking, dat de aanwezigheid van dit orgaan het ontstaan dezer lichaampjes tegengaat, en onderzocht nu allereerst menschelijke embryo's in een tijdperk, waarbij de milt tenminste nog geen haematopoëtische functie heeft, d.i. tot dat het embryo een lengte van 9 c.M. bereikt heeft. Inderdaad bleek, dat bij heel jonge embryo's, zoowel in het periphere bloed als in de lever (die reeds heel vroeg een haemopoëtische functie heeft) talrijke polychromatische megaloblasten en normoblasten met normaal uitziende kern en lichaampjes van JOLLY in het protoplasma aanwezig waren. Bij oudere embryo's (4 c.M. lengte) bevonden deze lichaampjes zich in het periphere bloed in groote getale, terwijl zij in de lever ontbraken. Bij oudere stadia (boven 9 c.M.) gelukte het nooit, nòch in het stroomende bloed, nòch in de bloedbereidende organen deze lichaampjes aan te toonen. In pathologische gevallen (pernicieuse anaemie) kon KNOLL (1925), zoowel in het periphere bloed als in het beenmerg, zijn bij embryo's gevonden uitkomsten bevestigen. Ook hier kwamen lichaampjes van JOLLY voor in megaloblasten en normoblasten met volkomen normaal uitziende kern. Een bewijs te meer voor zijn veronderstelling, dat deze lichaampjes met ontaarde kernen niets uit te staan hebben, was het verschijnsel, dat in het beenmerg talrijke ontaardingsvormen van normoblasten zonder deze lichaampjes gevonden werden. Van welk celbestanddeel zij dan wel afkomstig zijn, blijft voor den schrijver voorloopig een onopgeloste vraag.

Door NISSLE (1905; 1907) is het chromatinestofje van WEIDENREICH opgevat als het achtergebleven centrosoma van den normoblast. Ook BREMER (1895) heeft het lichaampje, door hem in kernlooze roode bloedlichaampjes gevonden en stigma genoemd, dat overeenkomt met het chromatinestofje, later met het centrosoma geïdentificeerd.

e. Polychromasie.

Bij kleuring van bloedpraeparaten met basische en zure kleurstoffen nemen bijna alle roode bloedlichaampjes de zure kleurstof

op. Tegenover deze orthochromatische erythrocyten (of orangeophile lichaampjes bij kleuring met triacid) staan diegene, welke ook min of meer de basische kleurstof opnemen: polychromatische bloedlichaampjes. Dit verschijnsel is door EHRLICH (1880) in anaemisch bloed na kleuring met haematoxyline en eosine waargenomen, en beschouwd als een in het periphere bloed ontstane degeneratie (coagulatienecrose) van het discoplasma der roode bloedlichaampjes; vandaar de naam „anaemische degeneratie", welke hij aan het verschijnsel gaf. Volgens EHRLICH zou dit verschijnsel vooral bij oudere bloedlichaampjes optreden; het discoplasma zou daarbij eiwitten uit de bloedvloeistof opnemen en zoo de eigenschap verkrijgen van zich met kernkleurstoffen te kleuren. Gelijktijdig verliest het discoplasma het vermogen het haemoglobine in zich gesloten te houden, terwijl dan de graad der discoplasmadegeneratie en de afgifte van haemoglobine aan de omgeving parallel loopen.

Verschillende feiten wezen er op, dat polychromatische roode bloedlichaampjes inderdaad gedegenereerde cellen waren: *a.* reeds het microscopisch aspect wees op een degeneratie; hoe sterkere polychromasie, hoe vagere contouren, alsof het bloedlichaampje aan een oplossingsproces onderworpen was; *b.* sterke polychromasie werd aangetroffen in het bloed van dieren, die eenigen tijd geen voedsel hadden gekregen, waar dus van een bloedregeneratie geen sprake kon zijn, doch waar de inanitie juist een degenereerende werking op verschillende weefsels uitoefende; *c.* na acute sterke bloedingen neemt men bij den mensch in de eerste 24 uur aan talrijke erythrocyten het verschijnsel der polychromasie waar, terwijl de afwezigheid van kernhoudende roode bloedlichaampjes er op zou wijzen, dat de bloedregeneratie thans nog niet is ingetreden.

Een soortgelijke meening als EHRLICH omtrent het wezen der polychromasie vormden zich dan ook ULLMANN (1898), MARAGLIANO en CASTELLINO (1892).

Echter werden polychromatische erythrocyten ook onder normale omstandigheden, vooral in de bloedbereidende organen en zeer duidelijk bij embryo's aangetroffen, waar talrijke, zoowel kernhoudende als kernlooze lichaampjes aanwezig zijn, zoodat GABRITSCHEWSKY (1891) (van wien de naam polychromatophilie

of polychromasie afkomstig is) de stelling verkondigde, dat polychromasie geen teeken van degeneratie is, doch juist als uiting van de jeugdigheid van erythrocyten moet worden opgevat. ASKANAZY (1893) deelde deze meening; als oorzaak zou het nog niet volledig ontwikkeld zijn van de hoeveelheid haemoglobine moeten worden beschouwd.

EHRLICH erkende het voorkomen van vele polychromatische erythrocyten en normoblasten in de bloedbereidende organen, doch kon van zijn meening omtrent een degeneratieve verandering der bij anaemie in den bloedsomloop voorkomende erythrocyten niet geheel en al afstand doen. Hij wijzigde nu zijn inzicht in dien zin, dat laatstgenoemde lichaampjes wel is waar als jeugdige, doch tevens als gedegenereerde cellen moeten worden opgevat.

Ook HEINZ trof polychromasie aan bij jeugdige erythrocyten. Aan den anderen kant echter kleuren zich volgens HEINZ (zie ook 1904) op een of andere wijze beschadigde orthochromatische erythrocyten eveneens met basische kleurstoffen (methylviolet), zoodat ook van een polychromatische degeneratie terecht mag worden geproken.

ENGEL (1902) vond in het bloed en in de bloedvormende organen van varkensembryo's ortho- en polychromatische normoblasten, uit welke respectievelijk ortho- en polychromatische erythrocyten zouden ontstaan.

Evenals EHRLICH beschouwt ENGEL de polychromasie als een degeneratieverschijnsel.

ASCHHEIM (1902) bestudeerde de vorming van roode bloedlichaampjes in milt en beenmerg van muizen onder normale omstandigheden en na bloedverlies. Onder beide omstandigheden trof hij er polychromatische kernhoudende roode bloedlichaampjes aan, bij welke de kern niet pyknotisch, doch juist chromatinearm, en radiair gebouwd was; deze cellen bevatten weinig protoplasma. Volgens den schrijver zou polychromasie niet wijzen op degeneratie, doch berusten op de aanwezigheid van slechts weinig haemoglobine. Rijpere cellen met meer haemoglobine zouden de basophiele grondstof eveneens bezitten, doch door te sterke kleuring van het acidophiele haemoglobine zou zij niet voor den dag treden. Na bloedverlies waren in het periphere bloed talrijke polychromatische bloedlichaampjes aanwezig, welke opvielen door hun

grootte. Dit grooter worden zou volgens ASCHHEIM berusten op wateropname, veroorzaakt door de hydraemie van het bloed, en dus een relatief gering haemoglobinegehalte tengevolge hebben.

JOST (1902) kwam bij zijn onderzoek over de bloedontwikkeling bij runderen- en schapenembryo's tot de meening, dat orthochromatische erythrocyten nooit in polychromatische overgaan. In gevallen dus, waar polychromatische roode bloedlichaampjes worden gevonden, zooals bij het embryo of bij anaemische toestanden, zijn deze slechts op te vatten als een vervanging voor de normale roode bloedlichaampjes.

Met de opvattingen van ASCHHEIM vereenigen zich echter verschillende onderzoekers. CESARIS DEMEL (1901) ziet zelfs in den graad der methyleenblauwkleuring een maatstaf voor het rijker of minder rijke haemoglobinegehalte der erythrocyten. Ook volgens WEIDENREICH (1904) berust de polychromasie zonder eenigen twijfel op een tekort aan haemoglobine. Doordat minder haemoglobine aanwezig is, treedt nu volgens dezen onderzoeker de blauwe kleur van de basophiele kernmembraan sterker op den voorgrond. Polychromatische bloedlichaampjes kunnen dus zoowel gedegenereerde als jonge cellen zijn. Volgens PAPPENHEIM (1912) stammen de haemoglobine-bevattende erythroblasten van haemoglobine-vrije basophiele lymphoïede voorstadia, de z.g. lymphoïede erythroblasten of lympherythroblasten, die op hun beurt weer ontstaan zijn uit een indifferente lymphoïedocytaire stamcel. De lymphoïede erythroblasten vormen in hun protoplasma het haemoglobine en verliezen hun basiplasma, waardoor zij van basophiel worden tot eosinophiel, met als tusschenstadium de polychromasie. Dit stadium der polychromasie zou overeenkomen met het promyelocytenstadium der granulocyten. Uit de polychromatische normoblasten ontstaan door kernrijping (d.i. kernverlies) en protoplasmarijping (d.i. verlies van het basiplasma) de orthochromatische erythrocyten, welke beide processen onafhankelijk van elkaar kunnen verloopen, zoodat uit de polychromatische erythroblast eerst de orthochomatische erythroblast en vervolgens de orthochromatische erythrocyt, of eerst de polychromatische en dan de orthochromatische erythrocyt ontstaat. De polychromasie der roode bloedlichaampjes is volgens PAPPENHEIM juist een bewijs,

dat ook deze bloedlichaampjes van lymphoïede voorstadia afstammen. Het verdwijnen van het basiplasma geschiedt volgens den schrijver door, overal in het protoplasma plaats hebbende, chemische omzettingen.

NAEGELI (1923) meent op grond van het voorkomen van polychromatische bloedlichaampjes in het periphere bloed en in de bloedvormende organen, zoowel tijdens het intra- als extrauterine leven, en „auf Grund vieler klinischen Erfahrungen" met bijna alle onderzoekers te mogen besluiten, dat polychromasie uitsluitend bij jeugdige cellen voorkomt; dat degeneratieve veranderingen nooit tot polychromasie kunnen voeren en dat ook onder pathologische omstandigheden de polychromatische bloedlichaampjes in de circulatie steeds van een regeneratieve werking van het beenmerg afhankelijk zijn. Ook de meening, dat polychromatische erythrocyten weinig haemoglobine bevatten, zou onjuist zijn.

Terwijl dus volgens de eene groep van onderzoekers de polychromasie op een jeugdigheid der roode bloedlichaampjes is terug te voeren, volgens de andere als een degeneratieverschijnsel moet worden opgevat, komen beide hierin met elkaar overeen, dat zij de basophiele bestanddeelen zich uit het celplasma ontstaan denken. Hiertegenover staan anderen, die meenen, dat de basophiele substantie uit de celkern afkomstig zou zijn, en als resten van de verdwenen normoblastenkern moet worden opgevat, zich daarmee scharend onder de eerste groep van onderzoekers.

Zoo zegt HEINZ (1890): „Bei den eben ausgebildeten kernlosen roten Blutkörperchen ist durch kurze Zeit noch eine Andeutung vorhanden dasz in ihnen eine grosze Menge chromatische Substanz aufgelöst ist, nämlich die Polychromasie," en wil daarmee te kennen geven, dat polychromasie berust op de aanwezigheid van kernsubstantie in het protoplasma. Het orthochromatische bloedlichaampje zou dan verder uit het polychromatische ontstaan door verdwijnen dezer kernsubstantie. P. SCHMIDT (1902 e.v.) beschouwt de polychromasie, zoowel van kernhoudende als van kernlooze roode bloedlichaampjes, als een verder voortgeschreden stadium der basophiele puncteering, welke op haar beurt niets anders is als de uitdruk-

king van aanwezige kernsubstantie in het protoplasma. De aanwezigheid dezer kernsubstantie is te danken aan een voortgeschreden chromatolyse, of aan een wisselwerking tusschen kern en protoplasma, bestaande uit afgifte van kernbestanddeelen aan dit celplasma bij intacte kern of gedurende de mitotische kerndeeling. Volgens H. FISCHER (1909) wijst de basophilie van het protoplasma der erythroblasten op een vermeerderde stofwisseling, welke in de cel plaats heeft, n.l. op een sterke aanmaak van nucleoalbuminen in het protoplasma, welke van daar naar de celkern worden overgevoerd. Deze nucleoalbuminen hebben wegens hun zure eigenschappen een sterke affiniteit tot methyleenblauw en veroorzaken daardoor de blauwe kleur van het protoplasma. De basophilie is dus de morphologische uitdrukking van den celgroei en speciaal van den kerngroei, waarbij het substraat dezer basophilie niet uit de kern, doch uit het protoplasma afkomstig is, maar wel uit kernbestanddeelen is opgebouwd. De polychromasie der normoblasten en erythrocyten vormt dan de schakel tusschen basophilie en orthochromasie, en ontstaat door een menging van de zure nucleoalbuminen met het basische haemoglobine, dat eveneens in het protoplasma gevormd wordt.

Ook DE MOULIN (1923) schaart zich onder de rij der onderzoekers, die de polychromasie der roode bloedlichaampjes verklaren door de aanwezigheid van kernsubstanties.

f. Basophiele puncteering.

De basophiele puncteering is het eerst door GRAWITZ als degeneratief verschijnsel beschouwd en daarom „korrelige degeneratie" genoemd. Volgens vele onderzoekers zijn polychromasie en basophiele puncteering het morphologisch substraat van één en dezelfde stof (P. SCHMIDT, PAPPENHEIM, SCHILLING, e.a.). Dus evenals bij de polychromasie bestaat ook hier een rij van onderzoekers, welke zich de basophiele korrels uit het protoplasma ontstaan denken, terwijl een andere groep hen met de kern in verband brengt. Zoo meent PAPPENHEIM (1912), dat onder bepaalde pathologische omstandigheden, vóór het verdwijnen van het basiplasma uit het celplasma der erythrocyten, een samenklontering hiervan ontstaat, die aanleiding geeft

tot de vorming der zich met methyleenblauw kleurende korrels.

Tot diegenen, die zich de basophiele korrels uit de celkern ontstaan denken, behoort vooral P. SCHMIDT. In een reeks opstellen (1902 e.v.) vermeldt hij, hoe bij met loodnitraat vergiftigde konijnen een duidelijke loslating der korrels van de celkern was te zien. Eenige weken na de injectie traden n.l in het periphere bloed kernhoudende roode bloedlichaampjes op; om de kern dezer cellen was nu een groot aantal basophiele korrels te zien, terwijl de kern zelf haar scherpe contouren verloren had en inbochtingen vertoonde, in grootte overeenkomend met de basophiele korrels. Door FERRATA (men zie 1918) wordt in een reeks mededeelingen eveneens de opvatting verdedigd, dat deze korrels in genetisch verband met de kern staan, hoewel hij in zijn later verschenen leerboek op deze meening terugkomt en nu aanneemt, dat de basophiele puncteering op een samenklontering van protoplasmatische bestanddeelen berust.

Ook NAEGELI (1923) voelt zich tot een ontstaan der korrels uit de celkern aangetrokken, hoewel een bewijs voor deze meening nog niet afdoende geleverd is.

Door GRAWITZ en GRÜNEBERG (1906) zijn met behulp van ultraviolet licht microphoto's vervaardigd van bloedlichaampjes, waaronder zich basophiel gepuncteerde bevonden. Terwijl nu de kernen van leucocyten en normoblasten, als minder doorlaatbaar voor ultraviolette strælen, als duidelijke schaduwen te herkennen waren, toonden zich alle erythrocyten volkomen homogeen. Een bewijs dus, dat de korrels niet uit kernbestanddeelen zijn opgebouwd, een meening, waaraan zich WEIDENREICH volkomen aansluit.

g. Lininenetwerk van RUZICKA.

RUZICKA (1905) heeft bij behandeling van ongefixeerde uitstrijkpraeparaten van caviabloed met verdund zoutzuur, daarop volgende fixatie in sublimaat en kleuring met een carbolhoudende oplossing van chinablauw, een fraai blauw gekleurd netwerk in het protoplasma der roode bloedlichaampjes kunnen aantoonen. Op grond van uitkomsten van verteringsproeven, verricht op dit netwerk der bloedcellen, meent hij te mogen besluiten, dat de substantie, waaruit het opgebouwd is, nauw verwant is aan

nucleïnezuur, en komt tot de verstrekkende conclusie, dat in het cytoplasma der volwassen erythrocyten na verlies der kern een stof uit deze achterblijft, welke wel is waar geen chromatine is, doch wegens haar onoplosbaarheid in geconcentreerde oplossing van magnesiumsulfaat, ferrocyaankali en een 20% keukenzoutoplossing, gelijk gesteld moet worden aan de grondstof van het chromatine, d.i. het linine.

h. Het netwerk ontstaan bij vitale kleuring.

Na de onderzoekingen van ISRAEL en PAPPENHEIM over de vitale kleurbaarheid van roode bloedlichaampjes met neutraalrood, zijn nog verschillende methoden aangegeven, waarmee het mogelijk zou zijn om in sommige erythrocyten een netwerk aan te toonen. Terwijl door PAPPENHEIM e.a. de oorzaak van het ontstaan van dit netwerk op de aanwezigheid van lipoïeden wordt teruggebracht, meenen andere onderzoekers als R. SCHILLING en LUZZATTO een verband tusschen vitale kleuring en polychromasie te hebben waargenomen. Daarmee zouden dus, in navolging van sommige onderzoekers, ook de vitaal gekleurde bestanddeelen als kernresten moeten worden beschouwd. Dat een verband tusschen vitale kleuring eenerzijds en polychromasie en basophiele puncteering anderzijds niet bestaat, is door FERRATA op de volgende wijze aangetoond: Een eerst vitaal gekleurd en later met de methode van GIEMSA behandeld praeparaat toonde het voorkomen van vitaal gekleurde korrels, zoowel in ortho- als polychromatische roode bloedlichaampjes, aan.

j. Lichaampjes van HEINZ.

Door HEINZ (1890) werden, na toediening van verschillende bloedgiften (phenylhydrazine, toluyleendiamine, nitrobenzol, enz.), in de roode bloedlichaampjes van verschillende dieren één of meer korrels gevonden, die zich sterk kleurden met een oplossing van methylviolet in een physiologische keukenzoutsolutie. Deze korrels werden door den onderzoeker als gedegenereerd protoplasma beschouwd; slechts dit gedeelte der erythrocyt zou degenereeren, terwijl de rest intact blijft.

SCHWALBE en SOLLEY (1902) hebben eveneens den invloed van toluyleendiamine op het uiterlijk der roode bloedlichaampjes na-

gegaan. In tegenstelling met HEINZ meenen zij echter, dat het zich met methylviolet kleurende lichaam als een, op normale wijze in de erythrocyt aanwezig, of uit de laatste tredend bloedplaatje moet worden beschouwd. Niet alleen waren afsnoeringen van deze lichaampjes in vergiftigde roode bloedlichaampjes waar te nemen, ook bij de stolling van normaal bloed kon de overgang van deze, in de erythrocyten voorkomende, lichaampjes tot buiten de cel liggende bloedplaatjes vervolgd worden.

FRIEDSTEIN en SCHILLING meenen, dat de lichaampjes van SCHMAUCH, welke in het bloed van vergiftigde en normale katten werden aangetoond, voor het grootste gedeelte overeenkomen met de lichaampjes van HEINZ, en met de kern niets uit te staan hebben; voor een klein deel identiek zijn aan de lichaampjes van HOWELL en JOLLY en dan als kernresten moeten worden beschouwd.

k. Theorie van SCHILLING.

Voor zoover mij bekend is, is SCHILLING de eenige geweest, die de uiteenloopende structuren, welke men in een rood bloedlichaampje kan aantreffen, onder één gezichtspunt heeft trachten te brengen, en op grond van al die verschillende structuren een bouw van de erythrocyt heeft geconstrueerd, welke een verklaring voor al het gevondene zou kunnen geven. Hij zelf zegt (1912): „Von der Idee ausgehend, dasz alle sich in pathologischen Verhältnissen zeigenden Veränderungen des gewöhnlichen bekannten Erythrocyten schlieszlich, soweit nicht fremdartig und exogen, in einem abgeänderten Strukturbestandteil ihre alleinige Erklärung finden könnten, kam ich sehr bald zu einer Anschauung vom Bau des Erythrocyten, die sich met keiner der bisherigen, obwohl in Einzelheiten ähnlich, ganz decken wollte."

Het essentieële van de theorie van SCHILLING is, dat de erythrocyt als een werkelijke cel, gelijk aan elke andere lichaamscel wordt beschouwd, welke bij het ouder worden echter sterk is gemodificeerd. Het jonge roode bloedlichaampje bezit morphologisch alle elementen van elke andere cel; doch ook aan de volwassen erythrocyt moet het bezit hiervan worden toegekend, zij het ook, dat de verschillende celbestanddeelen histologisch niet altijd even gemakkelijk zijn aan te toonen. De elementen, waaruit een cel, en dus ook de erythrocyt, zijn opgebouwd, zijn: 1°. de

kern, respectievelijk kernrest; 2°. het *protoplasma*, bestaande uit ecto- en endoplasma met de er in aanwezige protoplasmadifferentiëeringen als celmembraan, crusta of stroma en het haemoglobine; 3°. het *archoplasma*, bestaande uit het centrosoma, het glaslichaam, en bijzondere differentiaties als het apparato reticolare interno van GOLGI, welke onder den naam van kapsellichaam worden samengevat.

Uit een groote reeks onderzoekingen meent hij de volgende conclusies te mogen trekken: De kern der roode bloedlichaampjes kan gemakkelijk worden uitgestooten, en verandert dan, buiten het cellichaam gekomen, tot bloedplaatjes. Indien men slechts snel werkende fixatieven gebruikt, zijn allerlei overgangen te constateeren tusschen de zich in het roode bloedlichaampje bevindende kern, de uittredende kern en het bloedplaatje. Polychromasie en basophiele puncteering berusten op de aanwezigheid van basophiele substantie in het protoplasma, terwijl de lichaampjes van SCHMAUCH, de chromatinestofjes en de lichaampjes van HEINZ als het centrosoma of de zich daarin bevindende centriolen moeten worden opgevat.

l. Eigen onderzoek.

In de eerste plaats werd nagegaan, welke stadia van de degenereerende normoblastenkern konden worden aangetroffen. Hiertoe werden, naast uitstrijkpraeparaten van het periphere bloed, stukken lever en milt van embryo's van muizen en ratten, en van pasgeboren katten gefixeerd in de vloeistoffen van HELLY en ORTH. Bovendien werden uitstrijkpraeparaten gemaakt van het perssap van deze organen, en van het beenmerg van volwassen dieren. Naast de nuclealreactie werden steeds kleuringen verricht met haematoxyline en eosine, volgens DOMINICI en volgens PAPPENHEIM.

Als resultaat van het onderzoek van een groot aantal praeparaten kan worden meegedeeld, dat zoowel met de nuclealreactie als met andere kleuringen alleen normale en pyknotische normoblastenkernen konden worden waargenomen. Beiden kleuren zich bij behandeling volgens FEULGEN en ROSSENBECK donkerviolet. Overgangsstadia tusschen den normoblast met pyknotische kern en het kernlooze roode bloedlichaampje werden niet gezien. Nòch

karyorhectisch, nòch karyolytisch gedegenereerde kernen waren in de praeparaten aantoonbaar.

Wat betreft de lichaampjes van HOWELL en JOLLY en van SCHMAUCH, in uitstrijkpraeparaten van het periphere bloed van pasgeboren en jonge katten (± één week oud) konden na PAPPENHEIM — of GIEMSA —kleuring in verschillende erythrocyten duidelijk kleine violetrood gekleurde lichaampjes worden opgemerkt. Liggen deze lichaampjes excentrisch, dan beantwoorden zij volkomen aan het beeld der chromatinestofjes. Bij toepassing der nuclealreactie kon nergens in erythrocyten een positief reageerend lichaampje worden aangetoond. Nòch bij verandering van hydrolysetemperatuur of hydrolysetijd, nòch bij weglating der hydrolyse konden violet gekleurde structuren in het erythrocytenprotoplasma worden waargenomen.

Voor het bestudeeren der polychromasie werden uitstrijkpraeparaten gemaakt van het bloed van normale konijnen, caviae, ratten en muizen, waar steeds, zooals bekend is, een tamelijk groot aantal polychromatische bloedlichaampjes worden aangetroffen. Daarnaast werden ongefixeerde uitstrijkpraeparaten gedurende eenige weken in de broedstoof bij 37° C. bewaard. Onderzoekingen van BODON en HIRSCHFELD toch hebben geleerd, dat het aantal polychromatische bloedlichaampjes in bloed, dat in capillairen werd toegesmolten en in de broedstoof werd bewaard, sterk in aantal toeneemt. Deze uitkomsten heb ik voor de ongefixeerde uitstrijkpraeparaten, die in de broedstoof verblijf hadden gehouden, volkomen kunnen bevestigen. In al deze gevallen werd echter bij toepassing der nuclealreactie nergens een diffuus violette kleur aangetroffen, ook niet indien de hydrolyse gewijzigd of achterwege gelaten werd.

Voor het onderzoek van basophiel gepuncteerde erythrocyten diende het bloed van met loodnitraat vergiftigde ratten. Nadat eerst subcutane inspuitingen van een oplossing van loodnitraat werden toegepast, moest deze wijze van toediening wegens het ontstaan van groote necrotische plekken verlaten worden. Overgegaan werd toen tot de door KEIL aangegeven methode: de dieren werden nu n.l. gevoed met een loodalbuminaat, dat op de volgende wijze wordt verkregen: Bij 100 c.c. van een 5 % nutroseoplossing wordt onder omroeren 5 c.c. van een 10 % loodacetaat-

oplossing toegevoegd. Het dikke kaasachtige neerslag wordt met water uitgewasschen en het water door middel van alcohol en aether verwijderd. Dan wordt de massa in de broedstoof gedroogd, waarbij een vaste lijmachtige stof ontstaat. Deze wordt na eenige dagen tot een harde massa, welke fijn gewreven in het voedsel der dieren wordt gemengd. 7 % der geheele massa bestaat, bij analyse van het albuminaat, uit loodoxyde. Wanneer men de doseering der geheele massa verdeelt over 7—10 dagen, dan blijken na dit tijdsverloop talrijke erythrocyten met basophiele puncteering in het bloed der dieren aanwezig te zijn. Het best zijn deze korrels met de methyleenblauwkleuring te herkennen. Wanneer men echter de nuclealreactie verricht, dan worden ook hier nergens violet gekleurde structuren in het protoplasma der roode bloedlichaampjes aangetroffen.

Behalve talrijke basophiel gepuncteerde erythrocyten, zijn in het bloed der met lood vergiftigde ratten ook vele bloedlichaampjes met vitaal kleurbaar net aanwezig. Dit net werd aangetoond door een uitstrijkpraeparaat te vervaardigen op een objectglas, waar te voren een 1 % alcoholische oplossing van brilliantkresylblauw was uitgestreken en verdampt. Verder werd het bloed van een patiënt met haemolytischen icterus onderzocht, waarin talrijke roode bloedlichaampjes met een vitaal kleurbaar net aanwezig bleken te zijn. Ook in deze beide gevallen echter was het met de nuclealreactie niet mogelijk een violet gekleurd net in sommige erythrocyten aan te toonen.

Het door Ruzicka beschreven lininenetwerk in roode bloedlichaampjes kon, bij toepassing der door hem aangegeven methode, in het protoplasma van alle erythrocyten van verschillende dieren (mensch, hond, kat, konijn cavia, rat, muis) op meer of minder duidelijke wijze worden aangetoond. De door den schrijver aangegeven methode geschiedt als volgt:

Aan de lucht gedroogde uitstrijkpraeparaten worden door een oplossing van 7 % zoutzuur gehaemolyseerd, dan goed in water nagespoeld en in een geconcentreerde waterige sublimaatoplossing gefixeerd. De kleuring geschiedt dan gedurende enkele minuten met een mengsel van twee deelen 5 % karboloplossing en één deel 1 % chinablauwoplossing in water.

Worden de praeparaten echter niet met de chinablauwoplossing

gekleurd, doch volgens FEULGEN en ROSSENBECK behandeld, dan is van een violet gekleurd netwerk niet het minst te bespeuren. Trouwens het blijkt, dat het z.g. lininenetwerk zich niet alleen met chinablauw doch ook met eosine laat kleuren. Het ontstaan er van is m.i. een kunstproduct, veroorzaakt door de sterk destructieve werking van het zoutzuur.

Terwijl alle genoemde structuren negatief reageeren op de nuclealreactie van FEULGEN en ROSSENBECK, bleek in één geval een violette kleuring te worden verkregen. Het betrof het bloed van een patiënt, waar, enkele dagen geleden, de milt om bijzondere redenen was geëxstirpeerd. In het volgens de methode van PAPPENHEIM gekleurde praeparaat blijken talrijke normoblasten aanwezig te zijn. Naast normale kernen treft men hier pyknotisch en karyorhectisch gedegenereerde aan, en in een enkel rood bloedlichaampje is nog een klein gedeelte der gedegenereerde kern over in den vorm van het lichaampje van JOLLY. Past men op dit praeparaat de nuclealreactie toe, dan ziet men, dat het beeld hiermee verkregen, volkomen beantwoordt aan dat der PAPPENHEIM-praeparaten, d.w.z., dat in de normoblasten overgangen te zien zijn van de normale kern, via de pyknotische en karyorhectisch uiteengevallen kern, tot een klein lichaampje, dat zich eveneens violet kleurt met het zwaveligzure fuchsine. M.a.w. *het blijkt, dat hier het lichaampje van* JOLLY *wel uit nucleïnezuurhoudende bestanddeelen is opgebouwd.*

Vergelijkt men nu het beeld van het JOLLY-lichaampje uit dit praeparaat met dat uit het kattenbloed, dan blijkt, dat bij de kleuring volgens PAPPENHEIM beiden verschillend gekleurd worden. Terwijl de eerste een donkerviolette kleur aannemen, worden de laatste violetrood getint.

Ook KNOLL (1925) vermeldt, dat in zijn praeparaten de lichaampjes van JOLLY veel rooder gekleurd waren dan het chromatine der leucocyten- of normoblastenkernen, volgens hem een reden te meer, om zich deze lichaampjes niet van de gedegenereerde normoblastenkern ontstaan te denken.

Ik meen nu op grond van de uitkomsten met de nuclealreactie te mogen aannemen, dat men in de literatuur onder lichaampjes van JOLLY steeds twee verschillende structuren heeft samengevat.

In de eerste plaats een structuur, welke niet van de kern afkomstig is, geen positieve nuclealreactie vertoont, vooral in het bloed van katten, en zooals KNOLL heeft aangetoond in het bloed van vele embryo's, waar de milt een nog weinig functioneerend orgaan is, voorkomt, het eerst door HOWELL en later door SCHMAUCH is beschreven, en lichaampjes van HOWELL-JOLLY wordt genoemd. Het is niet onmogelijk, dat dit lichaampje identiek is met het centrosoma. In de tweede plaats echter een structuur, die als rest van de normoblastenkern moet worden opgevat, waaraan men eveneens den naam lichaampje van HOWELL-JOLLY heeft toegekend. Beiden zijn vooral met de nuclealkleuring van elkaar te onderscheiden.

J. Bloedplaatjes.

Het is niet mijn bedoeling hier een uitvoerig overzicht te geven van de meeningen, welke over de herkomst der bloedplaatjes bestaan: meeningen, welke ook nu nog verre van eensluidend zijn. Het zij genoeg mede te deelen, dat naast de meening van WRIGHT en OGATA (1902), welke zich het ontstaan der bloedplaatjes door afsnoering van protoplasmadeeltjes der megakaryocyten uit het beenmerg denken (een theorie, welke thans nog de meeste aanhangers telt), andere onderzoekers een opvatting huldigen, dat het bloedplaatje als een op zich zelf staande cel moet worden opgevat (DEKHUYZEN 1901 e.a.), terwijl weer andere meenen, dat het bloedplaatje de uit de erythrocyten getreden en uiteengevallen kern vertegenwoordigt (SCHILLING). De aanhangers der laatste theorieën nemen dan ook een structuur in het bloedplaatje aan, overeenkomend met de kern van andere cellen, en bestaande uit nucleoproteïden. Zoo spreken sommige onderzoekers (o.a. DE MOULIN 1923) van het chromatine van het bloedplaatje.

Het zou een groote steun voor beide laatstgenoemde opvattingen zijn, indien met de nuclealmethode positief reageerende substanties in het bloedplaatje konden worden aangetoond.

Eigen onderzoek.

Dit werd verricht aan uitstrijkpraeparaten van bloed van menschen en verschillende dieren (hond, kat, konijn, cavia, rat, muis).

In geen enkel geval konden in bloedplaatjes, waar bij kleuringen volgens PAPPENHEIM duidelijk roodviolette korrels te zien waren, violet gekleurde structuren worden aangetoond, nòch bij wijziging van hydrolyseduur of hydrolysetemperatuur, nòch bij weglating der hydrolyse.

Deze uitkomst pleit dus sterk tegen de opvatting, dat bloedplaatjes op zich zelf staande cellen met celkern, of uitgetreden erythrocytenkernen zijn.

Hier zij nog aan toegevoegd, dat evenmin in het protoplasma der megakaryocyten (onderzocht werden uitstrijkpraeparaten van beenmerg van ratten en muizen) een positieve nuclealreactie kan worden aangetoond.

HOOFDSTUK VI.

Over het voorkomen van stoffen in het protoplasma, welke eveneens het zwaveligzuur fuchsine kleuren, doch niet uit nucleïnezuur bestaan.

Reeds bij hun eerste onderzoekingen merkten FEULGEN en zijn medewerkers op, dat het fuchsinezwaveligzuur, behalve door het nucleal, nog door andere substanties in weefsels gekleurd werd. Het bleek n.l., dat in het protoplasma van verschillende cellen een stof voorkwam, welke wel is waar positief reageerde, doch zich in menig ander opzicht van het nucleal (d.i. dus van het thyminezuur) onderscheidde. Reeds direct werd vermoed, dat deze stof een aldehyd zou zijn, en al bleek ook onjuist de veronderstelling, dat men hier met het aceetaldehyd te maken had (een stof, welke volgens onderzoekingen van NEUBERG als een intermediair stofwisselingsproduct bij de alcoholische gisting zou optreden), zoo gaven andere uitkomsten (reductie van een ammoniakale zilveroplossing; oplosbaarheid in phenylhydrazine) toch steun aan de opvatting deze substantie als een aldehyd te beschouwen. Uit hun proefnemingen meenen FEULGEN en VOIT (1924) te mogen opmaken, dat deze stof met aldehydkarakter onoplosbaar is in water, oplosbaar in organische oplosmiddelen (alcohol, chloroform, xylol), in de weefsels echter niet als zoodanig voorkomt, doch er waarschijnlijk gebonden is aan onbekende componenten. Deze vermoedens zijn op het volgende gebaseerd: In microscopische praeparaten van verschillende organen, die in sublimaat waren gefixeerd en in paraffine ingesloten, was het den onderzoekers opgevallen, dat na hydrolyse en na inwerking van het fuchsinezwaveligzuur niet alleen de celkern, doch tevens de elastische vezels, in de arteriën voorkomend, positief reageeren. De mogelijkheid van het voorkomen van

nucleïnezuur in elastische vezels moest worden uitgeschakeld door het feit, dat de laatsten zich ook zonder voorafgegane hydrolyse violet kleuren. Om een denkbeeld te krijgen van de verspreiding van dit aldehyd in verschillende weefsels, en om daarbij den wellicht schadelijken invloed der verschillende chemicaliën, waarmee het orgaan vóór de inbedding in paraffine in aanraking komt, uit te schakelen, werden vriescoupes van ongefixeerd weefsel aan de inwerking van het reagens van SCHIFF blootgesteld. Nu bleek, dat dit aldehyd in de verschillende dierlijke weefsels zeer verspreid voorkomt. Zoo vertoonden de cellen van een vriescoupe van een ongefixeerde rattennier, na hydrolyse en na inwerking van het zwaveligzure fuchsine, niet alleen een violet gekleurde kern, doch tevens paars gekleurd protoplasma. Zeer merkwaardig was, dat na een kortdurende fixatie der coupes in een 1% sublimaatoplossing vóór het toepassen der nuclealreactie een veel spoediger kleuring van het zwaveligzure fuchsine in het weefsel tot stand komt. De op deze wijze behandelde praeparaten vertoonen reeds enkele minuten, nadat zij in de oplossing van fuchsinezwaveligzuur zijn gebracht, een intensief violette kleur, terwijl ongefixeerde coupes na dit tijdsverloop nog geheel ongekleurd zijn. De onderzoekers nemen op grond hiervan aan, dat in het protoplasma een stof voorkomt, welke door sublimaat onmiddellijk, door het in het zwaveligzure fuchsine aanwezige zuur eerst na langeren tijd, in een aldehyd wordt veranderd. Aan dit aldehyd hebben zij den naam van *plasmal* gegeven, aan het in het protoplasma aanwezige voorstadium er van den naam van *plasmalogeen*. Uit het onderzoek op verschillende weefsels bleek, dat het plasmalogeen in het dierlijk lichaam zeer verspreid voorkomt.

Een onderscheid tusschen het plasmal en het nucleal bestaat dus hierin, dat het laatste slechts door hydrolyse van kernbestanddeelen ontstaat, terwijl het eerste door sublimaat en zuren uit het plasmalogeen wordt gevormd. Plasmalogeen en plasmal onderscheiden zich verder van het nucleal hierin, dat zij oplosbaar zijn in verschillende organische oplosmiddelen (alcohol, chloroform, xylol, benzol, e.a.), zich hierin dus als een lipoïed gedragen. Een uitzondering op dezen regel moet gemaakt worden voor de elastische vezels. Dat de hierin voorkomende, met

zwaveligzure fuchsine positief reageerende, stof identiek is met het plasmal van andere weefsels, bleek hieruit, dat vriescoupes door de aorta zich volkomen op dezelfde wijze gedragen als vriescoupes door andere organen. De onderzoekers meenen echter, dat de elastische vezels in het algemeen de eigenschap bezitten om verschillende stoffen vast te adsorbeeren; door deze adsorbtie zou het plasmal bij de behandeling met alcohol of andere oplosmiddelen niet in oplossing kunnen gaan.

Volgens Vosz (1926) zou het bezit van plasmal, dat weerstand biedt tegen de inwerking van alcohol, niet voor alle elastische vezels gelden, doch uitsluitend voor die, welke in den bloedvatwand voorkomen.

Eigen onderzoek.

In de eerste plaats werden de proeven van Feulgen en Voit herhaald om het resultaat van hun onderzoekingen eventuëel te kunnen bevestigen. Er zij hier direct gezegd, dat mijn uitkomsten volkomen overeenstemmen met de door hen meegedeelde. Inderdaad waren in verschillende dierlijke weefsels (onderzocht werden vriescoupes door de nieren en spieren van muizen en ratten) stoffen aanwezig, welke zich op de door Feulgen en Voit beschreven wijze gedragen. Ook zonder voorafgegane hydrolyse reageeren zij positief met het zwaveligzure fuchsine; sublimaat heeft een veel sneller totstandkoming der kleuring ten gevolge; alcoholbehandeling doet de reactie negatief uitvallen.

Ook in gefixeerde en in paraffine ingesloten organen was een violetkleuring van de elastische vezels, welke in den arteriënwand voorkomen, waar te nemen. In tegenstelling met Vosz vond ik, dat niet alleen het elastische weefsel van arteriën, doch alle in het lichaam voorkomende elastische vezels zich violet kleuren met het reagens van Schiff. Onderzocht hierop werden: aorta, bloedvaten in verschillende organen, oorkraakbeen, epiglottis, trachea, longen, onderhuids-bindweefsel. De fixatie geschiedde in sublimaat, vloeistof van Zenker, absoluten alcohol, vloeistof van Hofker. In al deze gevallen werd een meer of minder duidelijke violetblauwe kleuring der elastische vezels waargenomen. Bekijkt men b.v. een dwarscoupe door de trachea

van een menschelijk foetus van 37 c.M., gefixeerd in het mengsel van HOFKER, dan zijn de onder het epitheel liggende, in de lengterichting der trachea verloopende, elastische vezels als fijne violetblauwe puntjes te zien. VOSZ zelf geeft aan in het oorkraakbeen een positieve reactie te hebben waargenomen, doch meent, dat het oorkraakbeen niet tot het elastisch, doch tot het celrijk kraakbeen behoort, d.w.z. overwegend zou bestaan uit cellen, die door tamelijk smalle brugjes van homogene tusschenstof gescheiden zijn. Deze homogene tusschenstof vertoont nu een sterke plasmalkleuring. Of de hierin aanwezige substantie identiek zou zijn met het plasmal in elastische vezels moet voorloopig nog in het midden worden gelaten.

Deze uitspraak van VOSZ moet eenige verwondering wekken. Niet wat betreft het resultaat der reactie; in het oorkraakbeen van verschillende dieren (konijnen, ratten, muizen), op verschillende wijzen gefixeerd (sublimaat, vloeistof van ZENKER, absolute alcohol), kon ook ik een duidelijke violetblauwe kleuring met zwaveligzure fuchsine verkrijgen. Doch wel wat betreft de interpretatie van het geval. Naar ik meen behoort het kraakbeen in het oor tot de klassieke voorwerpen, welke steeds als voorbeeld voor elastisch kraakbeen worden aangehaald. Al bevat het inderdaad vele cellen, aan een praeparaat, waarop de elastinekleuring is toegepast, kan men zich gemakkelijk van de aanwezigheid van elastische vezels in de tusschenstof overtuigen. In de resultaten, welke ook door VOSZ met de plasmalkleuring op het oorkraakbeen verkregen zijn, kan men dus een bevestiging zien van de opvatting, dat het in alcohol onoplosbaar plasmal zich niet uitsluitend tot de elastische vezels der bloedvatwanden beperkt.

Uit de voorgaande hoofdstukken is gebleken, dat in enkele cellen stoffen voorkomen, die in dit opzicht op het plasmal der elastische vezels gelijken, dat ook zij bleken onoplosbaar te zijn in alcohol, en in staat waren het fuchsinezwaveligzuur te kleuren zonder voorafgaande hydrolyse. Dit positief reageerende bestanddeel werd gevonden in:

1°. het darmepitheel van Ascariden;

2°. de epidermis, in die gedeelten, waar verhoorning begint op te treden.
3°. sommige granula van mestcellen.

Van de nog niet vermelde cellen, waaraan soms een violette kleuring werd waargenomen, welke ook zonder voorafgaande hydrolyse optrad, moeten nog worden genoemd:

4°. het willekeurig spierweefsel. De kleuring, die hier werd aangetroffen, was meestal zeer zwak;
5°. de levercellen;
6°. sommige slijmcellen.
7°. vaginaal epitheel.

De vraag doet zich voor, of in al deze weefsels éénzelfde stof oorzaak is der violetkleuring na behandeling met het reagens van SCHIFF, en of deze stof eventuëel zou overeenkomen met het door FEULGEN en VOIT beschreven plasmal.

Vraagt men zich af, of de opgesomde weefsels een gemeenschappelijke stof bezitten, waarvan de chemische samenstelling wat nader bekend is, dan blijkt, dat in enkele ervan zoo'n stof is aan te wijzen. En wel vormt voor de levercellen, het willekeurig spierweefsel, de epidermis en het darmepitheel van Ascaris het *glykogeen* een gemeenschappelijk bezit. Voor het spierweefsel en de levercellen is dit zonder meer duidelijk. Voor de epidermis is reeds op bl. 105 vermeld, dat door UNNA en zijn medewerkers een ontstaan van glykogeen bij de verhoorning werd vastgesteld, welk glycogeen vooral in het stratum intermedium in groote concentratie kan voorkomen. De toepassing der methode van FEULGEN en ROSSENBECK leerde dan ook, dat juist in dit gebied de intensiefste violette kleur werd aangetroffen.

Vooral door het onderzoek van R. EHRLICH (1909) is gebleken, dat glykogeen in groote hoeveelheden in het protoplasma der darmepitheelcellen van Ascariden kan voorkomen.

Men zou dus op grond van deze uitkomsten geneigd zijn, de positief reageerende stof voor glykogeen te houden. Indien men echter wat van het zuiver bereide poedervormige glykogeen in de oplossing van zwaveligzuurfuchsine suspendeert, ziet men niets bijzonders gebeuren; het mengsel blijft kleurloos.

Hetgeen er ook voor zou pleiten, dat niet het glykogeen met de methode van FEULGEN en ROSSENBECK wordt aangetoond, is het

verschijnsel, dat sommige glykogeenhoudende weefsels negatief reageeren. Zoo kon b.v. in de deciduacellen van de placenta van menschen en muizen (gefixeerd in sublimaat en vloeistof van ZENKER) geen positieve reactie worden verkregen. Ook uitstrijkpraeparaten van de vernix caseosa, welke volgens UNNA en GOLODETZ (1911) buitengewoon rijk aan glykogeen is, reageeren negatief.

Aan den anderen kant echter pleiten de volgende waarnemingen en overwegingen voor de aanwezigheid van een stof, welke, zoo dan al geen glykogeen, toch in eenig verband met het laatste moet staan. Vooreerst blijkt bij glykogeentoename in de lever de plasmalreactie sterker te worden. Een rat kreeg gedurende enkele dagen een koolhydraatrijke voeding (veel brood en suiker opgelost in melk). Dan werd het dier gedood. Opdruppelen van wat vloeistof van LUGOL op de sneevlakte der lever leverde een sterke mahoniehoutbruine kleuring daar ter plaatse op. Stukken der lever werden gefixeerd in absoluten alcohol, sublimaat en vloeistof van ZENKER. Werden de praeparaten op de door FEULGEN en ROSSENBECK aangegeven wijze behandeld, dan bleek een sterkere diffuse violette kleur der levercellen te zijn opgetreden dan in leverweefsel van ratten, welke zonder de koolhydraattoediening waren gedood. Achterwege laten der hydrolyse had geen invloed op het resultaat der kleuring.

En verder ziet men, dat methoden, in de histologie gebruikt ter herkenning van glykogeen, dikwijls een positieve reactie geven in het protoplasma der op bl. 163 genoemde weefsels. Met de karmijnmethode van BEST kleurt zich niet alleen het glykogeen, doch ook het mucine in slijmcellen en de korrels in mestcellen nemen de roode kleurstof op. Ook met de methylvioletmethode van CREIGHTON worden behalve het glykogeen, het mucine en de mestcelgranula gekleurd. VASTARINI-CRESI heeft zijn glykogeenkleuring met kresofuchsine door een toeval ontdekt. Bij een onderzoek aangaande het voorkomen van elastische vezels in de urethra van menschelijke embryo's vond hij, dat met het resorcine-fuchsine van WEIGERT behalve de elastische vezels donkerviolet, nog korreltjes in epitheelcellen en dwarsgestreepte spiervezels rood gekleurd werden. Verder onderzoek leerde, dat deze korrels uit glykogeen bestonden.

(Voor nadere bijzonderheden zie men VOORHOEVE 1924). Dus ook hier blijkt een overeenkomst in gedrag te bestaan tusschen glykogeen en elastische vezels.

Aangezien nu de op bl. 163 genoemde weefsels zich tegenover de aldehydkleuring van SCHIFF geheel op dezelfde wijze gedragen; en aangezien deze weefsels een min of meer duidelijke „glykogeenkleuring" vertoonen, ligt het vermoeden voor de hand de in die weefsels voorkomende positief reageerende substantie als één en dezelfde stof op te vatten, welke in chemisch opzicht in nauwe betrekking staat tot het glykogeen. Ook de chemische samenstelling van het glykogeen zou er niet mee in strijd zijn, dat zich een voorstadium of een afbraakproduct er van gedraagt als een aldehyd.

Op grond van deze feiten zou ik willen voorstellen aan deze stof voorloopig den naam van *glykogenoïed* toe te kennen.

Het is niet onmogelijk, dat dit glykogenoïed geïdentificeerd zal moeten worden met het hexosediphosphorzuur, een intermediair stofwisselingsproduct, dat volgens nieuwere onderzoekingen van MEYERHOF e.a. ontstaat bij de verandering van glykogeen tot melkzuur.

Dit vraagstuk zal echter, als minder in overeenstemming met het doel van dit proefschrift, tot een nog nader te verrichten onderzoek moeten worden uitgesteld.

Rest nog de vraag, of dit glykogenoïed overeenkomt met het plasmal, welks aanwezigheid door FEULGEN en VOIT in verschillende cellen is beschreven. Deze onderzoekers identificeeren het plasmal in vriescoupes van verschillende weefsels met de zich in elastische vezels bevindende positief reageerende stof. Aangezien ik meen, dat de laatste gelijk is aan de in slijmcellen, epidermis, enz. gevonden substantie, zou dit er dus op neerkomen, dat het glykogenoïed identiek is aan het plasmal. Als kenmerken van het plasmal hebben FEULGEN en VOIT aangegeven: oplosbaarheid in organische oplosmiddelen, en het snelle ontstaan uit plasmalogeen onder invloed van sublimaat, het langzamere ontstaan hieruit onder invloed van zuren. Gaat men na, of het glykogenoïed aan deze kenmerken beantwoordt, dan valt het resultaat in negatieven zin uit:

1°. *Oplosbaarheid in organische oplosmiddelen.*

Voor de positieve reactie van het elastineplasmal in paraffinecoupes nemen FEULGEN en VOIT aan, dat deze stof zóó vast aan de elastische vezels is geadsorbeerd, dat de invloed van alcohol, enz. onwerkzaam is. Mij komt deze verklaring zeer gewrongen voor. Bovendien zou zij misschien nog van toepassing kunnen zijn op de elastische vezels; voor het slijm, de korrels in mestcellen, enz. kan zij moeilijk gelden. Praeparaten, die dagenlang in alcohol of chloroform hebben gelegen, vertoonen nog een even duidelijke reactie als andere, hetgeen trouwens ook door FEULGEN en VOIT voor het elastineplasmal wordt toegegeven.

2°. *Ontstaan uit het plasmalogeen.*

Indien ook het glykogenoïed onder invloed van sublimaat uit een voorstadium zou worden gevormd, mag men verwachten, dat praeparaten, welke in niet-sublimaathoudende mengsels zijn gefixeerd, geen of slechts een zwak violette kleuring met het zwaveligzure fuchsine vertoonen bij niet al te lange blootstelling aan de inwerking van het laatste. Het gebruik van een niet-sublimaathoudend fixatief (absolute alcohol) heeft dat vermoeden niet kunnen vestigen. Ook praeparaten, die op deze wijze gefixeerd zijn, vertoonen een even duidelijke glykogenoïedkleuring na langer of korter inwerking van het fuchsinezwaveligzuur als de in sublimaat-gefixeerde.

Op grond hiervan kan men dus het glykogenoïed niet identificeeren met het plasmal van FEULGEN en VOIT.

Het wil mij voorkomen, dat plasmal een stof is die, wellicht als intermediair stofwisselingsproduct, overal in de dierlijke weefsels is aan te treffen, oplosbaar is in organische oplosmiddelen en daarom in de in paraffine ingesloten organen niet is aan te toonen, terwijl het glykogenoïed slechts daar voorkomt, waar haar aanwezigheid ook op andere wijze (histochemische reactie op glykogeen) kan worden vastgesteld.

HOOFDSTUK VII.

Samenvatting.

Overziet men, aan het eind van het onderzoek gekomen, de verkregen resultaten, dan mag worden gezegd, dat de reactie van FEULGEN en ROSSENBECK is te beschouwen als een *microchemische* reactie op kernbestanddeelen, en dat in al die gevallen, waar met de gewone kernkleurstoffen celbestanddeelen worden aangetoond, waarvan men zeker weet, dat zij van de kern afkomstig zijn (degeneratie van kernen, enz.) de nuclealreactie een positieve uitkomst geeft. Daarbij zijn ook de fijnste deeltjes, afkomstig uit de kern, nog duidelijk te herkennen. Men mag dus op grond hiervan aannemen, dat van celstructuren, welke door kernkleurstoffen gekleurd worden, doch met de reactie van FEULGEN en ROSSENBECK niet kunnen worden aangetoond, een herkomst van en een bestaan uit het chromatine der celkern niet waarschijnlijk mag worden geacht. In dit opzicht is gebleken, dat verschillende structuren, (chromidiaalapparaat e.a.), waarvan door enkele onderzoekers wordt gemeend, dat zij hun ontstaan aan het kernchromatine te danken hebben, geen nucleïnezuurverbindingen bevatten, terwijl de aanwezigheid van nucleïnezuur in andere structuren (lichaampjes van NISSL e.a.) wel kon worden vastgesteld. De vorm waarin we het nucleïnezuur aantoonen is het *nucleal*.

Daarnaast wordt echter nog een andere stof in dierlijke weefsels met het reagens van SCHIFF gekleurd, waarvan echter het bestaan uit nucleïnezuur onwaarschijnlijk is. Aan deze stof is de naam van *glykogenoïed* gegeven, omdat zij naar alle waarschijnlijkheid met het glykogeen in genetisch verband staat. Van het nucleal is deze stof echter te onderscheiden door haar positieve reactie zonder voorafgaande hydrolyse, terwijl zij tevens

(of een met haar verbonden voorkomende stof) reageert op kleurstoffen, welke dienen om het glykogeen microchemisch aan te toonen.

In dierlijke weefsels komt verder nog een aldehyd voor (hetwelk zich dus eveneens met het reagens van SCHIFF kleurt), waaraan FEULGEN en VOIT den naam van *plasmal* hebben gegeven. Wegens haar oplosbaarheid in organische oplosmiddelen is deze stof in de gewone microscopische praeparaten (afkomstig van organen, die in paraffine zijn ingesloten) niet aanwezig.

Aangezien dus de reactie op nucleïnezuur duidelijk te onderscheiden is van die op plasmal of glykogenoïed, mag men besluiten, dat *de nuclealreatie van* FEULGEN *en* ROSSENBECK *als een groote aanwinst voor de histologie moet worden beschouwd, en een waardevol middel beteekent voor het histochemisch aantoonen van nucleïnezuurhoudende celbestanddeelen.*

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

1 ALTMANN 1899 Ueber Nukleïnsäuren. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.*

2 APOLANT 1901 Ueber den Verhornungsprozesz. *Arch. f. mikr. Anat.* 57.

3 ARCANGELI 1909 Einige histologische Beobachtungen über das Deckepithel des Oesophagus beim Meerschweinchen. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 47.

4 ARIENS KAPPERS 1919. Het wezen van het kleurproces. *Geneesk. Bladen. 21e reeks.* N°. 10.

5 ARNOLD 1896. Ueber die feinere Struktur der hämoglobinlosen und hämoglobinhaltigen Knochenmarkzellen. *Virch. Arch.* 144.

6 ARNOLD 1896. Zur Morphologie und Biologie der roten Blutkörper. *Virch. Arch.* 145.

7 ARNOLD 1905. Die Morphologie der Milch- und Colostrumsekretion. *Ziegl. Beitr.* 58.

8 ARNOLD 1910. Enthalten die Zellen des Knochenmarkes, die eosinophilen insbesondere, Glykogen? *Zentralbl. f. allg. Path. u. Pathol. Anat.* 21.

9 ARNOLD 1913. Ueber die Granula der eosinophilen Zellen und der Mastzellen. *Zentralbl. f. allg. Path. u. Path. Anat.* 24.

10 ARNOLD 1914. Ueber Plasmastrukturen und ihre funktionelle Bedeutung. Fischer Jena.

11 ASCHHEIM 1902. Zur Kenntnis der Erythrocytenbildung. *Arch. f. mikr. Anat.* 60.

12 ASCHOFF 1923. Pathologische Anatomie. Bd. 1 en 2. 6e Aufl. Fischer Jena.

13 BABKIN, RUBASCHKIN, SZAWITSCH 1909. Ueber die morphologischen Veranderungen der Pancreaszellen unter der Einwirkung verschiedenartiger Reize. *Arch. f. mikr. Anat.* 74.

14 BECHHOLD 1921. Bau der roten Blutkörperchen und Hämolyse. *Münch. med. Woch.* 68 N°. 5.

15 BECHHOLD 1922. Die Kolloïde in Biologie und Medizin 4° Aufl. Dresden.

16 BECHHOLD, KRAUS 1920. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen. *Bioch. Zeitsch.* 109.

17 BENDA 1890. Das Verhältnis der Milchdrüse zu den Hautdrüsen *Dermatol. Zeitsch.* 1.

18 BERKA 1910. Glykogen und eosinophile Zellen. *Zentralbl. f. allg. Pathol. u. Pathol. Anat.* 21.

19 BETANCÈS 1926. Les granulations nécrotiques ou melanoïdes des eosinophiles. *Compt rend. Soc. de Biol.* 94.

20 Bethe 1903. Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems. Leipzig.
21 Bizzozero, Ottolenghi 1899. Histologie der Milchdrüse. *Ergebn. Anat. u Entw.* 9.
22 Bizzozero, Vasale 1887. Ueber die Erzeugung und physiologische Degeneration der Drüsenzellen. *Virch. Arch.* 110.
23 Björkenheim 1913. Golgi's Apparato reticolare interno in den Plazentarepitheliën. *Arch. f. Gynaek.* 100.
24 Bodon 1903. Die morphologischen und tinktoriellen Veränderungen nekrobiotischer Blutzellen. *Virch. Arch.* 173.
25 Boellke 1904. Ueber die klinische Bedeutung der wichtigsten morphologischen Veranderungen an den roten Blutkörperchen. *Virch. Arch.* 176.
26 Bonnevie 1908. Chromosomenstudien. *Arch. f. Zellf.* 1.
27 „ 1908. Chromosomenstudien. *Arch. f. Zellf.* 2.
28 „ 1911. Chromosomenstudien. *Arch. f. Zellf.* 6.
29 Bremer 1895. Ueber das Paranuclearkörperchen der gekernten Erythrocyten nebst Bemerkungen über den Bau der Erythrocyten im Allgemeinen *Arch. f. mikr. Anat.* 45.
30 Bremer 1895. Die Identität des Paranuclearkörperchen der gekernten Erythrocyt mit dem Centrosom. *Arch. f. mikr. Anat.* 46.
31 Buchner 1909. Das accessorische Chromosom in Spermatogenese und Ovogenese der Orthopteren, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Reduktion. *Arch. f. Zellf.* 3.
32 Bühler 1895. Protoplasmastrukturen in Vorderhirnzellen der Eidechse. *Verh. d. Phys. med. Gesellsch. Würzburg* 29.
33 Busacca 1912. Sulla fine struttura delle coroide. *Ricerche fatte nel. Lab. di Anat. norm. della R. Univ. di Roma.*
34 Cabot 1903. Ring bodies (nuclear remnants?) in anaemic blood. *Journ. med. Res.* 9.
35 Calleja 1896. Distribucion y significacion de las cellulas cebadas de Ehrlich. *Rev. trimestr. microg.* 1.
36 Canon 1892. Ueber eosinophile Zellen und Mastzellen im Blute Gesunder und Kranker. *Deutsch med. Woch.* 18.
37 Carnoy 1884. Biologie cellulaire. Liège.
38 Cesaris Demel 1901. Osservazioni istologiche sul sangue *Arch. ital. de Biol.* 36.
39 Chambers 1923—'24. The physical structure of protoplasma determined by micro-dissection and injection. *Publications of Cornell University Medical College. Dep. of Anat.* 10.
40 Champy 1911—'12 Recherches sur l'absorption intestinale et le rôle des mitochondries dans l'absorption et la sécrétion *Arch. d'Anat. micr.* 13.
41 Chrzonszczewsky 1864 Zur Anatomie der Niere. *Virch. Arch.* 31.
42 Ciaccio 1913. Ueber die Anwesenheit von lipoiden Substanzen in den Mastzellen. *Zentralbl. f. allg. Path. u. Path. Anat.* 24.
43 Clara 1925 Ueber den Bau des Schnabels der Waldschnepfe. *Zeitsch. f. mikr. anat. Forsch.* 3.
44 Dekhuyzen 1901 Ueber Thrombocyten. *Anat. Anz.* 19.

45 Downey 1913 The development of the histogenous mast-cells of adult guinea-pig and cat and the structure of the histogenous mast-cells of man. *Fol. Haem.* 16.
46 Dubreuil 1913 Le chondriome etc. *Arch. d'Anat. micr.* 15.
47 Duesberg 1907 Der Mitochondrialapparat der Wirbeltiere und Wirbellosen. *Arch. f. m. Anat.* 71.
48 Duesberg 1910: Nouvelles recherches sur l'appareil mitochondrial des cellules séminales. *Arch. f. Zellf.* 6.
49 Deusberg 1911 Plastosomen, Apparato reticolare interno und Chromidialapparat. *Ergebn Anat. Entw.* 20.

50 Eberth, Muller 1892 Untersuchungen über das Pancreas. *Zeitsch f. Wisse Zool.* 53.
51 ver Eecke 1895 Modifications de la cellule pancréatique pendant l'activité sécrétoire. *Arch. de Biol.* 13.
52 P. Ehrlich 1877. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwandung in der mikroskopischen Technik. *Arch. f. mikr. Anat.* 13.
53 P. Ehrlich 1879. Beiträge zur Kemtnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch. f. Anat. u. Phys. Phys. Abt.*
54 P. Ehrlich 1880. Anämische Befunde. De - und Regeneration roter Blutscheiben. *Charité Annalen. Berlin.*
55 P. Ehrlich 1891. Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. Berlin.
56 P. Ehrlich, Lazarus 1898. Die Anämie. Nothnagel's spezielle Pathologie u. Therapie Bd. 8.
57 R. Ehrlich 1909. Die physiologische Degeneration der Epithelzellen des Ascarisdarmes. *Arch. f. Zellf.* 3.
58 Engel 1899. Demonstration embryologischer Blutpräparate zur Veranschauligung des Kernschwundes. *Berl. kl. Woch.* N°. 26.
59 Ernst 1896. Studien über normale Verhornung mit Hilfe der Gramschen Methode *Arch. f. mikr. Anat.* 47.
60 Ernst 1915. Die Pathologie der zelle. Handbuch d. allg. Path. von Krehl und Marchand Bd. 3 1° Abteilung. Leipzig.

61 Fauré—Frémiet 1909—'10. Etude sur les mitochondries des protozoaires et des cellules sexuelles. *Arch. de l'Anat. micr.* 11.
62 Feringa 1922. Over de emigratie van witte bloedlichaampjes. Diss. Groningen.
63 Ferrata 1918. Le Emopatie.
64 Feulgen—Brauns 1924. Untersuchungen über die Nuclealfärbung. *Pflüg. Arch.* 203.
65 Feulgen, Rossenbeck 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleïnsäure vom Typus der Thyminucleïnsäure. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 135.
66 Feulgen, Voit 1924. Ueber den Mechanismus der Nuclealfärbung. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 135.
67 Feulgen, Voit 1924. Ueber einen weitverbreiteten festen Aldehyd. *Pflüg. Arch.* 206.
68 A. Fischer 1899. Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena.

69 H. Fischer 1909. Myeloische Metaplasie und fötale Blutbildung und deren Histogenese. Berlin.
70 Flemming 1876. Studien über die Beschaffenheit des Zellkernes. *Arch. f. mikr. Anat.* 13.
71 Flemming 1878. Beiträge zur Kenntnis der Zelle *Arch. f. mikr. Anat.* 16.
72 Flemming 1882. Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. Leipzig.
73 Flemming 1891. Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle. *Ergebn. d. Anat. u. Entw.* 37.
74 Flemming 1893—'98. Die Zelle. Referate *Ergebn. d. Anat. u. Entw.*
75 Flemming 1895. Ueber den Bau der Spinalganglienzellen bei Säugetieren. *Arch. f. mikr. Anat.* 46.
76 Flemming 1897. Die Struktur der Spinalganglienzellen bei Säugetieren *Arch. f. Psych.* 29.
77 Franz 1924. Mikroskopische Anatonie der Hilfsteile des Sehorgans der Wirbeltiere. *Ergebn. Anat. u. Entw.* 25.
78 Freundlich 1923. Kapillarchemie. Leipzig.
79 Gabritschewsky 1891. Klinische hämatologische Notizen. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 28.
80 Gajewska 1918. Ueber die morphologischen Veränderungen der Kern und Plasmasubstanz im Verlaufe des Wachstums der Oocyte. *Arch. f. Zellf.* 14.
81 Gajewska 1919. Ueber den sogenannten Dotterkern der Umphibiën *Arch. f. Zellf.* 15.
82 Galeotti 1895. Ueber die Granulationen in den Zellen I, II, III. *Int. Monatsch. f. Anat. u. Physiol.* 12.
83 Gatenby 1917. The cytoplasmic inclusions of the germ cells. *Quart. Journ. micr. Sc.* 62.
84 Gatenby 1919. The cytoplasmic inclusions of the germ cells. *Quart. Journ. micr. Sc.* 63.
85 Georgievics 1912. Ueber Adsorption in Lösungen. *Koll. Zeitsch.* 10.
86 „ 1914. Ueber Adsorption in Lösungen. *Koll Zeitsch.* 14.
87 Gilson 1890. Recherches sur les cellules sécrétantes. La soie et les appareils sérigènes *La Cellule* 6.
88 Grawitz 1899. Ueber Körnige Degeneration der roten Blutzellen. *Deutsch. med. Woch.* N°. 36.
89 Grawitz 1900. Die klinische Bedeutung und experimentelle Erzeugung Körniger Degeneration in den roten Blutkörperchen. *Berl. kl. Woch.* N°. 7 *en* 9.
90 Grawitz 1901. Ueber plasmotrope und plasmolytische Giftbildung im Organismus. *Deutsch. med. Woch.* N°. 52.
91 Grawitz 1906. Klinische Pathologie des Blutes 3° Aufl.
92 Grawitz, Grüneberg 1906. Projektionsbilder von mikrophotographischen Aufnahmen menschlicher Blutzellen mittels ultravioletten Lichtstrahlen. *Berl. kl. Woch* N°. 19.
93 Goldschmidt 1904. Der Chromidialapparat lebhaft funktionierender Gewebezellen. *Biol. Zentralbl.* 24.
94 Goldschmidt 1904. Der Chromidialapparat lebhaft funktionierender Gewebezellen. Histologische Untersuchungen an Nematoden. *Zool. Jahrb.* 21.

95 GOLDSCHMIDT 1909. Das Skelett der Muskelzelle von Ascaris, nebst Bemerkungen über den Chromidialapparat der metazoënzelle. *Arch. f. Zellf.* 4.
96 GOLDSCHMIDT 1910. Kleine Beobachtungen und Ideen zur Zellenlehre. *Arch. f. Zellf.* 6.
97 GROSZ 1917. Beobachtungen und Versuche an lebenden Zellkernen. *Arch. f. Zellf.* 14.
98 GULLAND 1895. On the granular leucocytes. Journ. gen. Physiol. 19.
99 „ 1906. Classification origin and probable role of leucocytes, mastcells and plasmacells. *Fol. Haem* 3.

100 HAECKER 1893. Das Keimbläschen, seine Elemente und Lageveränderungen' *Arch. f. mikr. Anat.* 41 *en* 42.
101 HAMMAR 1897. Ueber Sekretionserscheinungen im Nebenhoden des Hundes. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Suppl. Bd.*
102 HAMMERSCHLAG 1921. Zur Morphologie der Erythrocytenkerne. *Arch. f. mikr. Anat.* 95.
103 HARRIS 1900. Histology and microchemic reactions of some cells to anilin dyes. *Phil. med. Journ.* (*Ref. Zeitsch. f. wiss. mikr.* 17).
104 M. HEIDENHAIN 1890. Beiträge zur Kenntnis der Topographie und Histologie der Kloaska und ihrer drüsigen Adnexa bei den einheimischen Tritonen. *Arch. f. mikr. Anat.* 35.
105 M. HEIDENHAIN 1907. Plasma und Zelle. Jena. I en II.
106 R. HEIDENHAIN 1874. Versuche über den Vorgang der Harnabscheidung. *Arch. f. ges. Physiol.* 9.
107 HEINZ 1890. Morphologische Veränderungen der roten Blutkörperchen durch Gifte. *Virch. Arch.* 122.
108 HEINZ 1902. Der Uebergang der embryonalen kernhaltigen roten Blutkörperchen in kernlosen Erythrocyten. *Virch. Arch.* 168.
109 HEINZ 1904. Handbuch der experimentellen Pathologie und Pharmakologie. Bd. 1. Jena.
110 HELD 1897. Beiträge z. Struktur der Nervenzelle. *Arch. f. Anat. u. Entw.*
111 HELLY 1906. Die hämopoetischen Organe. Nothnagel's spezielle Pathologie u. Therapie Bd. 8.
112 HENRY 1900. Fonction sécrétoire de l'epididyme chez les vertébrés supérieurs. *Arch. d'Anat. micr.* 3.
113 O. HERTWIG 1923. Allgemeine Biologie 7° Aufl. Jena.
114 R. HERTWIG 1902. Protozoën und die Zelltheorie. *Arch. f Protestenk.* 1.
115 R. HERTWIG 1902. Ueber das Wechselverhältnis von Kern und Protoplasma. *Sitz. ber. Morphol. Ges. München.*
116 R. HERTWIG 1904. Ueber physiologische Degeneration bei Actinosphaerium Eichhornii. *Festschr. f. Häckel.*
117 VAN HERWERDEN 1913. Ueber die Nucleasewirkung auf tierische Zellen. *Arch. f. Zellf.* 10.
118 VAN HERWERDEN 1914. Nuclease als reageermiddel op nucleïnezuur. *Onderz. physiol. lab. Utrecht.* 5° *reeks XV.*
119 VAN HERWERDEN 1915. Ueber die Nuclease als Reagens auf Nucleïnsäureverbindungen der Zelle. *Anat. Anz.* 47.
120 HERZOG 1908. Ueber das Vorkommen von Blutkörperchenschatten im Blutstrom und über den Bau der Blutkörperchen. *Arch. f. mikr. Anat.* 71.

121 Höber 1914. Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. Leipzig.
122 Hollande 1922. La cellule pericardiale des insectes. *Arch. d'Anat. micr.* 18.
123 Hoven 1911. Du rôle du chondriome dans l'élaboration des produits de sécrétion de la glande mammaire. *Anat. Anz.* 39.
124 Hoven 1912. Contribution à l'étude et fonctionnement des cellules glandulaires. *Arch. f. Zellf.* 8.
125 Howell 1890. The life history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journ. Morph.* 4.

126 Israel 1899. Bemerkung zu der Arbeit von Schmauch: „Ueber endoglobuläre Körperchen in den Erythrocyten der Katze." *Virch. Arch.* 156.
127 Israel, Pappenheim 1896. Ueber die Entkernung der Säugetiererythroblasten *Virch. Arch.* 143.

128 Jacobi 1912. Ueber die Entstehung des Hautpigments, besonders die Rolle der Mastzellen bei der Pigmentbildung. *Diss. Königsberg Ref. Fol. Haem.* 16 1914).
129 Jarisch 1891. Zur Anatomie und Herkunft des Oberhaut- und Haarpigments *Arch. f. Derm. u. Syph.* 23.
130 Jarisch 1892. Ueber Anatomie und Entwicklung des Oberhautpigments beim Frosche *Urch. f. Derm. u. Syph.* 24.
131 Jarisch 1892. Ueber die Bildung des Pigments in den Oberhautzellen. *Arch. f. Derm. u. Syph.* 24.
132 Jesionek 1916. Biologie der gesunden und kranken Haut. Leipzig.
133 Jolly 1899—1900. Recherches sur la division indirecte des cellules lymphatiques granuleuses de la moelle des os. *Arch. d'Anat. mirc.* 3.
134 Jolly 1900. Clasmatocytes et Mastzellen. *Compt. rend. Soc. Biol.* 52.
135 Jolly 1904. Recherches experimentales sur la division indirecte des globules rouges. *Arch. d'Anat. micr.* 6.
136 Jolly 1905. Sur la formation des globules rouges des mammifères. *Compt. rend. Soc. de Biol.* 58.
137 Jolly 1905. Sur l'evolution des globules rouges dans le sang des embryons de mammifères. *Compt. rend. Soc. de Biol.* 58.
138 Jolly 1907. Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. *Arch. d'Anat. micr.* 9.
139 Jolly 1923. Traité technique d'Hematologie I en II. Paris.
140 Jörgensen 1910. Beiträge zur Kenntnis der Eibildung, Reifung, Befruchtung und Furchung bei Schwämmen. *Arch. f. Zellf.* 4.
141 Jörgensen 1913. Zellenstudien I, II, III. *Arch. f. Zellf.* 10.
142 Jost 1902. Beitrag zur Lehre von der Blutentwicklung des embryonalen Rindes und Schafes. *Arch. f. mikr. Anat.* 61.

143 Kanthak; Hardy 1894. On the characters and behaviour of the wandering cells of the frog, especially in relation to micro-organisms. *Phil. Transact.* 185.
144 Kanthak; Hardy 1895. The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. *Journ. gen. Physiol.* 17.
145 Karpova 1925. Beobachtungen über den Apparat Golgi (nebenkern) in den Samenzellen von Helix pomatia. *Zeitsch. f. Zellf. u. mikr. Anat.* 2.

146 KEIL 1902. Ueber die sogenannte körnige Entartung der roten Blutkörperchen bei Vergiftungen. Arch. int. de Pharmacodyn. et de Ther. 10.
147 KITE 1913. Studies on the physical properties of protoplasm. *Am. Journ. Physiol.* 32.
148 KNOLL 1925. Jollykörper in menschlichen Erythroblasten phylogenetisch betrachtet. *Haematologica Arch. Ital. di emat. e sierol.* 6.
149 KÖHLER 1904. Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. *Zeitsch. f. wiss. mikr.* 21.
150 KÖLLIKER 1889. Handbuch der Gewebelehre des menschen 6° Aufl. Leipzig.
151 KOLLMANN, PAPIN 1915. L'epithelium corné de l'oesophage de quelques mammifères. *Arch. d'Anat. micr.* 16.
152 KORSCHELT 1896. Ueber de Struktur der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen. *Arch. f. mikr. Anat.* 47.
153 KORSCHELT 1897. Ueber den Bau der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen. *Arch. f. mikr. Anat.* 49.
154 KOSSEL 1882. Zur Chemie des Zellkernes. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 7.
155 KOSSEL 1886. Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkernes. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 10.
156 KOSSEL 1896. Ueber Nucleinsäure und Thyminsäure. *Zeitsch. f. phypiol. Chem.* 22.
157 KOSSEL, NEUMANN 1896. Ueber Nucleinsäure und Thyminsäure. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 22.
158 KREIBICH 1921. Ueber die Natur der basophilen Erythrocytengranula. *Berl. kl. Woch.* N°. 26.
159 KROMAYER 1892. Die Protoplasmafaserung der Epithelzelle. *Arch. f. mikr. Anat.* 39.
160 KRÜGER 1923. Studien an Cirripedien. Die Cementdrüsen von Scalpellum. *Arch. f. mikr. Anat.* 1923.
161 KÜHNE 1864. Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität Leipzig.
162 LAWDOWSKY 1893. Blut und Jodsäure und der sogenannte Chemotropismus. *Zeitsch. f. wiss. mikr.* 10.
163 LEHNER 1924. Das Mastzellenproblem und die Metachromasiefrage. *Ergebn. Anat. u Entw.* 25.
164 LENHOSSEK 1895. Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuster Forschungen. Berlin.
165 LENHOSSEK 1895. Centrosom und Sphäre in den Spinalganglienzellen des Frosches. *Arch. f. mikr. Anat.* 46.
166 LENHOSSEK 1897. Ueber den Bau der Spinalganglien des Menschen. *Arch. f. Psych.* 29.
167 LEPLAT 1912. Recherches sur le développement et la structure de la membrane vasculaire de l'oeil des oiseaux. *Arch. de Biol.*
168 DE LIGNAC 1922. Over vorming en afbraak van huidpigment. Diss. Leiden.
169 LILIENFELD 1887. Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Breslau.
170 LILIENFELD 1893. Ueber die Wahlverwandtschaft der Zellelemente zu gewissen Farbstoffen. *Du Bois Reymond's Arch.*

171 Limon 1902. Phenomènes histologiques de la sécrétion lactée. *Journ. de l'Anat. et Physiol.*
172 Löwenthal 1903. Beitrag zur Kenntnis der Struktur und der Teilung von Bindegewebszellen. *Arch. f. mikr. Anat.* 63.
173 Lubosch 1902. Ueber die Nukleolarsubstanz des reifenden Tritoneies. *Habilitationsschrift Jena.*
174 Luna 1912. L'apparato mitocondriale nelle cellule dal' epitelio pigmentato della retina. *Arch. f. Zellf.* 9.
175 Luna 1913. Ricerche sulla biologia dei condriosomi. Condriosomi e pigmento retinico. *Arch. f. Zellf.* 10.
176 Macallum 1891. Contributions to the Morphology and Physiology of the cell. *Trans. Canad. Inst.* 1.
177 Macallum 1908. Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung. *Ergebn. Physiol.*
178 Mac Kibben 1914. Mastcells in the menings of Necturus, easily mistaken for nervcells. *Anat. Rec.* 8.
179 Malfatti 1892. Beiträge zur Kenntnis der Nukleïne. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 16.
180 Marinesco 1905. Recherches sur le noyau. *Journ. f. Psych. u. Neurol.* 5.
181 Marchand 1898. Ueber die bei Entzündungen in der Peritonealhöhle auftretenden Zellformen, *Verh. Deutsch. pathol. Ges.* 1.
182 Marchand 1902. Ueber Clasmatocyten, Mastzellen und Phagocyten des Netzes. *Verh. Deutsch. pathol. Ges.*
183 Marchand 1922. Die Entwicklung des Entzündungsbegriffes in den letzten 50 Jahren. *Med. Klin.* 38.
184 Masson 1913. Imprégnation argentique du pigment. *Compt. rend. Soc. Biol.* 75.
185 Mathews 1897. Zur Chemie der Spermatozoën. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 23.
186 Maurer 1900. Die Tüpfelung der Wirtszelle der Tertianaparasiten. *Centralbl. f. Bakt.* 28.
187 Maximow 1903. Ueber Clasmatocyten und Mastzellen. *Zentralbl. Allg. Path. u Path. Anat.* 14.
188 Maximow 1905. Ueber die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Anat. Anz.* 27.
189 Maximow 1906. Ueber die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch. f. mikr. Anat.* 67.
190 May, Walker 1908. Note on the multiplication and migration of nucleoli in nerve cells of mammals. *Quart. Journ. exp. Physiol.* 2.
191 Mayer 1897. Beruht die Färbung der Zellkerne auf einem chemischen Vorgang oder nicht? *Anat. Anz.* 13.
192 Maziarski 1910. Sur les changements morphologiques de la structure nucléaire dans les cellules glandulaires. *Arch. f. Zellf.* 4.
193 Maziarski 1911. Recherches cytologiques sur les phenomènes sécrétoires dans les glandes filières des larves des Lépidoptères. *Arch. f. Zellf.* 6.
194 Meirowsky 1906. Die Entstehung des Oberhautpigments in der Oberhaut selbst. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 42.
195 Meirowsky 1906. Die Entstehung des Oberhautpigments aus der Substanz der Kernkörperchen. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 43.

196 MEIROWSKY 1906. Besitzt das atrophische Narbenepithel des Weissen die Fähigkeit zur Pigmentbildung? *Monatsh. f. prakt. Derm.* 43.
197 MEIROWSKY 1910 Kritisches zur Melaningenese. *Virch. Arch.* 199.
198 MEIROWSKY 1908. Zur Frage des Ursprungs der Mastzellengranulation. *Fol. Haem.* 6.
199 MEIROWSKY 1908. Ueber den Ursprung des melanotischen Pigments der Haut und des Auges. Leipzig.
200 MELISSINOS, NICOLAIDES 1889. Untersuchungen über einige intra- und extranucleäre Gebilde im Pancreas der Säugetiere. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.*
201 MENDES DA COSTA 1921. Onderzoekingen en ontdekkingen op het gebied der pigmenten. *Rede gehouden te Amsterdam.*
202 MERTSCHING 1888. Beiträge zur Histologie des Haares und Haarbalges. *Arch. f. mikr. Anat.* 31.
203 MERTSCHING 1899. Histologische Studien über Keratohyalin and Pigment. *Virch. Arch.* 116.
204 MEVES 1897. Zur Struktur der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen. *Arch. f. mikr. Anat.* 48.
205 MEVES 1900. Ueber den von VON LA VALETTE ST. GEORGE entdeckten Nebenkern der Samenzellen. *Arch. f. mikr. Anat.* 56.
206 MICHAELIS 1898. Beitrag zur Kenntnis der Milchsekretion. *Arch. f. mikr. Anat.* 51.
207 MICHAELIS 1902. Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen Berlin.
208 MIESCHER 1871. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzelle. *Mediz. chem. Untersuch. herausgegeben von Hoppe Seyler.*
209 MIESCHER 1876. Die Kerngebilde im Dotter des Hühnereies. *Med. chem. Untersuch. Hoppe Seyler.*
210 MIESCHER 1895. Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 37.
211 MIESCHER 1923. Die Pigmentgenese im Auge. *Arch. f. mikr. Anat.* 97.
212 V. MÖLLENDORFF 1923. Bemerkungen zur Beurteilung gefarbter Kernstrukturen in fixierten Präparaten. *Münch. med. Woch.* N°. 29.
213 V. MÖLLENDORFF 1924. *Ergebn. Anat. Entw.*
214 MONTGOMERY 1899. Comparative cytological Studies with especial regards to the morphology of the nucleolus. *Journ. of Morphol.* 15.
215 DE MOULIN 1923. Beiträge zur Kenntnis des Baues der Ganglienzellen. *Arch. f. Zellf.* 17.
216 DE MOULIN 1923. Untersuchung über das Wesen der Leukocytengranula. *Arch. f. Zellf.* 17.
217 DE MOULIN 1923. Der Verhornungsprozesz der Haut und der Hautderivate. *Anat. Anz.* 56.
218 DE MOULIN 1925. De levende celstructuur. *Ned. Tijdsch. v. Geneesk. II,* N° 2.
219 MÜHLMANN 1911. Studien über den Bau und das Wachstum der Nervenzellen. *Arch. f. mikr. Anat.* 77.
220 MÜHLMANN 1912. Mikrochemische Untersuchungen an der wachsenden Nervenzelle. *Arch. f. mikr. Anat.* 79.

221 NAEGELI 1923. Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. Berlin.

222 Negri 1899. Ueber die Persistenz des Kernes in den roten Blutkörperchen erwachsener Säugetiere. *Anat. Anz.* 16.
223 Nemec 1897. Ueber die Struktur der Diplopodeneier. *Anat. Anz.* 13.
224 Neumann 1881. Ueber Blutregeneration und Blutbildung. *Zeitsch. f. klin. med.* 3.
225 Neumann 1890. Ueber die Entwicklung roter Blutkörperchen im neugebildetem Knochenmark. *Virch. Arch.* 119.
226 Nissen 1886. Ueber das Verhalten der Kerne in den Milchdrüsenzellen. *Arch. f. mikr. Anat.* 26.
227 Nissl 1894. Ueber die sogenannten Granula der Nervenzellen. *Neurol. Centralbl.* 13.
228 Nissl 1894. Mitteilungen zur Anatomie der Nervenzelle *Allg. Zeitsch. f. Psych.* 50.
229 Nissl 1910. Nervensystem. *Encyclopädie der mikroskop. Techn. Berlin.*
230 Nissle 1905. Beobachtungen am Blut mit Trypanosomen geïmpfter Tiere. *Arch. f. Hyg.* 53.
231 Nissle 1907. Ueber Centrosomen und Dehlerschen Reifen in kernlosen Erythrocyten. *Arch. f. Hyg.* 61.
232 Nordmann 1885. Beiträge zur Kenntnis und namentlich zur Färbung der Mastzellen. *Intern. Monatsschr. f. Anat. u. Histol.* 2.

233 Obst 1899. Untersuchungen über das Verhalten der Nukleolen bei der Eibildung einiger Mollusken und Arachnoiden. *Zeitsch. f. wiss. Zool.* 26.
234 Ogata 1883. Die Veränderung der Pankreaszellen bei der Sekretion. *Arch. f. Anat. u Physiol Abt.*
235 Ogata 1912. Untersuchungen über die Herkunft der Blutplättchen. *Ziegl. Beitr.* 52.

236 Pappenheim 1895. Die Bildung der roten Blutscheiben. *Inaug. Diss. Berlin.*
237 Pappenheim 1896. Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Virch. Arch.* 145.
238 Pappenheim 1901. Grundrisz der Farbchemie zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. Berlin.
239 Pappenheim 1908. Ueber Mastzellen. *Fol. Haem.* 5.
240 Pappenheim 1912. Atlas der menschlichen Blutzellen. Jena.
241 Pekelharing 1917. Voordrachten over Weefselleer. Haarlem.
242 Philippson 1890. Ueber Hautpigment. *Fortschr. d. med.*
243 Platner 1889. Die Entstehung und Bedeutung der Nebenkerne im Pankreas. *Arch. f. mikr. Anat.* 33.
244 Plosz 1871. Ueber das chemische Verhalten der Kerne der Vogel- und Schlangenblutkörperchen. *Med. chem. Untersuch. Hoppe Seyler.*
245 Policard 1921. Précis d'histologie physiologique. Paris.
246 Poljakoff 1888. Ueber eine neue Art von fettbildenden Organen im lockeren Bindegewebe. *Arch. f. mikr. Anat.* 32.
247 Popoff 1907. Eibildung bei Paludina vivipara und Chromidiën bei Paludina und Helix. *Arch. f. mikr. Anat.* 70.
248 Posner 1889. Untersuchungen über Schleimhautverhornung. *Virch. Arch.* 108.

249 Pratje 1920. Die Chemie des Zellkernes. *Biol. Zentralbl.* 40.
250 Prenant 1911. Mitochondries de la peau et de la cornée des Amphibiens. *Compt. rend. Assoc. Anat. Paris.*

251 Rabl 1901. Histologie der normale Haut des menschen. *Mracek's Handb. d. Hautkrankh.* 1.
252 Ranvier 1875. Traité technique d'Histologie. Paris.
253 Ranvier 1879. Sur une substance nouvelle de l'epiderme et sur le processus de keritinisation du révêtement epidermique. *Compt. rend. Acad. Sc.* 88.
254 Ranvier 1882. Sur la structure des cellules du corps muqueux de Malpighi. *Compt. rend. Acad. Sc.* 95.
255 Ranvier 1883. De l'existence et de la distribution de l'eleidine de la muqueuse bucco-oesophagienne des mammifères. *Compt. rend. Acad. Sc.* 97.
256 Ranvier 1899. Histologie de la peau. *Arch. d'Anat. micr.* 3.
257 Ranvier 1890. Des clasmatocytes. *Compt. rend. Acad. Sc.* 110.
1890. Sur les éléments anatomiques de la serosité péritoneale. *Compt. rend. Acad. Sc.* 110.
258 Ranvier 1890. De la membrane du sac lymphatique oesophagien de la grenouille. *Compt. rend. Acad. Sc.* 111.
259 Ranvier 1891. Transformation in vitro des cellules lymphatiques en clasmatocytes. *Compt. rend. Acad. Sc.* 112.
260 Ranvier 1893. Les clasmatocytes, les cellules fixes du tissu conjonctive et les globules du pus. *Compt. rend. Acad. Sc.* 116.
261 Ranvier 1899. Des clasmatocytes. *Arch. d'Anat. micr.* 3.
262 Raudnitz 1883. Beiträge zur Kenntnis der im Bindegewebe vorkommenden Zellarten. *Arch. f. mikr. Anat.* 22.
263 Redenz 1925. Mikrochemischer Nachweis von Nukleïnsäure in den Nisslschollen der motorischen Ganglienzellen. *Klin. Woch.* N° 7 *bl.* 334.
264 Reinke 1894. Zellstudiën. *Arch. f. mikr. Anat.* 43.
265 Renaut 1893. Traîté d'histologie pratique I. Paris.
266 Rheindorff 1905. Naevus pigmentosus. Beziehungen desselben zu Sommersprossen und Chromatophoren. *Inaug. Diss. Berlin* (Ref. in Fol. Haem. 2).
267 Rindfleisch 1880. Ueber Knochenmark und Blutbildung. *Arch. f. mikr. Anat.* 17.
268 Rohde 1903. Untersuchungen uber den Bau der Zelle I. Kern und Kernkörperchen. *Zeitsch. f. wiss. Zool.* 73.
269 Romeis 1924. Taschenbuch der mikriskopischen Technik 11° Aufl. München.
270 Rosenstadt 1892. Untersuchungen über den Bau der Talgdrüsen. *Intern. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol.* 9.
271 Rosenstadt 1918. Bau der Epidermiszelle. *Arch. f. mikr. Anat.* 91.
272 Rössle 1904. Der Pigmentierungsvorgang in Melanosarkomen. *Zeitsch. f. Krebsf.* 2.
273 Ruzicka 1894. Untersuchungen über die ungeformten Elemente des Blutes. *Wien. allg. med. Ztg.*
274 Ruzicka 1905. Cytologische Untersuchungen über die roten Blutkörperchen. *Arch. f. mikr. Anat.* 67.

275 Ruzicka 1906. Struktur und Plasma Ergebn. *Anat. u. Entw.* 16.
276 Ruzicka 1908. Zur Kenntnis der Natur und Bedeutung des Plastins. *Arch. f. Zellf.* 1.

277 Salén 1920. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen *Broch. Zeitsch.* 110.
278 Saxer 1896. Ueber die Entwicklung und den Bau der normalen Lymphdrüsen und die Entstehung der roten und weissen Blutkörperchen. *Anat. Hefte* 6.
279 Schafer 1905. On the structure of erythrocyte. *Anat. Anz.* 26.
280 Schaffer 1907. Ueber das Farben der grobkörnigen oder sogenannten Mastzellen. *Zentralbl. f. Physiol.* 21.
281 Schaffer 1922. Lehrbuch der Histologie und Histogenese. 2°. Aufl. Leipzig.
282 Schaxel 1910. Die Morphologie des Eiwachstums und der Follikelbildungen bei den Ascidiën. *Arch. f. Zellf.* 4.
283 Schilling 1911. Der Säugetiererythrocyt als vollständige Zelle und seine Beziehung zum Blutplättchen. *Münch. med. Woch.* N°. 9.
284 Schilling 1911. Neue Ansichten über die Anatomie der Erythrocyten und des Blutplättchens der Säugetiere. *Verh. Anat. Ges. Leipzig.*
285 Schilling 1912. Erläuterungen zur Demonstration von Innenstrukturen der Erythrocyten und Blutplättchen sowie von Kurloffkörpern. *Verh. Anat. Ges. München.*
286 Schilling 1912. Malariaparasiten in polychromatischen und kernhaltigen Erythrocyten. *Arch. f. Schiffs u. Trop. hyg.* 16.
287 Schilling 1912. Zur Frage des Gelbfiebererregers. *Arch. f. Sch. u. Trop. hyg.* 16.
288 Schilling 1912. Ueber die Bedeutung neurer hämatologischen Befunde und Methoden für die Tropenkrankheiten. *Arch. f. Sch. u. Trop. hyg.* 16.
289 Schilling 1912. Ueber die mögliche Umwandlung von Strukturen zu Pseudoparasiten, Chlamydozoënkörper etc. in Erythrocyten und anderen Zellen. *Centralbl. f. Bakt.* 63.
290 Schilling 1921. Die Zelltheorie des Erythrocyten als Grundlage der klinischen Wertung anämischer Blutbefunde. *Virch. Arch.* 234.
291 Schilling 1924. Das Blutbild und seine klinische Verwertung 3° Aufl. Jena.
292 Schmauch 1899. Ueber endoglobuläre Körperchen in den Erythrocyten der Katze. *Virch. Arch.* 146.
293 Schmaus, Albrecht 1894. Ueber Karyorrhexis. *Virch. Arch.* 138 *Suppl. heft.*
294 M. B. Schmidt 1891. Ueber Blutzellenbildung in Leber und Milz unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Ziegl. Beitr.* 11.
295 P. Schmidt 1902. Experimentelle Beiträge zur Pathologie des Blutes. Jena.
296 P. Schmidt 1902. Zur Frage der Entstehung der basophilen Körner in den roten Blutkörperchen. *Deutsch med. Woch.* N°. 44.
297 P. Schmidt 1903. Ein Beitrag zur Frage der Blutregeneration. *Münch. med. Woch.* N°. 13.
298 P. Schmidt 1907. Ueber Bleivergiftungen und ihre Erkennung. *Arch. f. Hyg.* 63.

299 P. Schmidt 1908. Ueber Jugendstadien der roten Blutkörperchen. *Arch. f. mikr. Anat.* 72.
300 Schridde 1905. Die Protoplasmafasern der menschlichen Epidermiszelle. *Arch. f. mikr. Anat.* 67.
301 Schuberg 1903. Untersuchungen über Zellverbindungen. *Zeitsch. f. wiss. mikr.* 74.
302 Schumacher 1925. Zur Chemie der Zellkerne und einige Nukleinsäure-Eiweiszverbindungen. *Chemie A. Zelle u. Gewebe* 12.
303 Schwalbe, Solley 1902. Die morphologischen Veränderungen der Blutkörperchen speziell der Erythrocyten bei der Toluylendiaminvergiftung. *Virch. Arch.* 168.
304 Schwarz 1887. Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. *Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen* 5.
305 Schwarz, Herrmann 1922. Ueber die Metachromasie des Toluidinblaus. *Koll. Zeitsch.* 31.
306 Schwenter-Trachsler 1906. Ergebnisse von Untersuchungen an Mastzellen der Haut. *Monatsh. f. prakt Derm.* 43.
307 Schwenter-Trachsler 1908. Ueber Mücin und Mastzellenkörner. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 47.
308 Scott 1899. Structure, microchemistry and Development of nerve cells. *Trans. Canad. Inst.* 5.
309 Seidelin 1912. Zur Frage des Gelbfiebererregers. *Arch. f. Sch. u. Trop. hyg.* 16.
310 Selhorst 1890. Ueber das Keratohyalin und das Fettgegehalt der Haut. *Inaug Diss. Berlin.*
311 Staffel 1906. Zur Genese des melanotischen Pigmentes. *Münch. Med. Woch.* 1.
312 Staffel 1907. Die Genese des Hautpigments. *Verh. path. Ges.* 11.
313 Stassano, Haas 1900. Contribution à la physiologie des clasmatocytes. *Compt. rend. Soc. de Biol.* 52.
314 Steudel 1912. Ueber den Aufbau der Nukleinsäure aus der Thymusdrüse. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 77.
315 Steudel, Brigl 1911. Ueber die Thyminsäure. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 70.
316 Steinhaus 1892. Morphologie der Milchabsonderung. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Suppl.*
317 Strausz 1900. Basophile Körnchen in roten Blutkörperchen. *Deutsch med. Woch.* N°. 37.
318 Szily 1911. Ueber die Entstehung des melanotischen Pigmentes in Auge der Wirbeltierembryonen und in Chorioïdealsarkomen. *Arch. f. mikr. Anat.* 77.
319 Szymonowicz 1921. Histologie und mikroskopische Anatomie Leipzig 2° Aufl.

320 Tamura 1923. Morphologische Studien über Chromosomen und Zellkerne. *Arch. f. Zellf.* 17.
321 Telleysniczky 1905. Ruhekern und Mitose. *Arch. f. mikr. Anat.* 66.
322 Timofejewsky 1895. Zur Frage über die Regeneration der roten Blutkörperchen. *Zentralbl. f. allg. Path.* 6.

323 TSCHASCHIN 1914. Ueber die ruhenden Wanderzellen und ihre Beziehungen zu den anderen Zellformen des Bindegewebes und zu den Lymphocyten. *Fol. Haem.* 17.

324 ULMANN 1898. Einige persönliche Bemerkungen an Herrn ENGEL. *Virch. Arch.* 154.
325 UNGER 1898. Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Brustdrüse. *Anat. Hefte.*
326 UNNA 1887. Ueber weitere Versuche Farben auf dem Gewebe zu erzeugen und die chemische Theorie der Färbung. *Arch. f. mikr. Anat.* 30.
327 UNNA 1895. Keratohyalin. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 20.
328 UNNA 1896. Ueber das Wesen der normalen und pathologischen Verhornung. *Monatsh. f. prakt. Derm.* 23.
329 UNNA 1908. Ueber die Zusammensetzung und die Bedeutung der Hornsubstanzen. *Med. Klin.* 4.
330 UNNA 1909. Ueber Verhornung. *Med. Klin.* 5.
331 UNNA 1914. Eine gute Doppelfärbung für gewöhnliche und saure Kerne. *Zeitsch. f. wiss. mikr.* 31.
332 UNNA, GOLODETZ 1908. Neue Studien über Hornsubstanzen. *Monatsh. f. prakt Derm.* 44.
333 UNNA, GOLODETZ 1911. Neue Untersuchungen über Vernix caseosa. *Arch. f. Derm. u. Syph.* 107.
334 UNNA, GOLODETZ 1913. Ueber Granoplasma und eine ellgemeine Methode zur Chemischen Erforschung eiweiszhaltigen Zellbestandteilen. *Derm. Woch.* 56.
335 UNNA, GOLODETZ 1913. Biochemie der Haut. Jena. (Ook in OPPENHEIM's Handb. d. Biochemie Ergänzungsband).

336 VIGIER 1900. Note sur le rôle du nucléole dans la sécrétion. *Compt. rend. Soc. de Biol.*
337 VIGIER 1900. Le nucléole, morphologie et Physiologie. *Thèse Paris.*
338 VOORHOEVE 1923. La démolition des erythrocytes dans la rate. *Arch. néerland. de Physiol.* 8.
339 VOORHOEVE 1924. Glykogeenkleuring volgens VASTARINI-CRESI. *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.* 68 II N°. 12.
340 VOORHOEVE 1924. Over de structuur van het celprotoplasma. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 68 °. 26.
341 VOSZ 1925. Untersuchungen mit der nuclealreaktion. *Klin. Woch.* N°. 7.
342 VOSZ 1925. Untersuchungen mit der Nuclealreaktion. *Verh. Anat. Ges.* 60.
343 VOSZ 1925. Demonstration mikroskopischer Präparata mit Plasmalfärbung. *Sitzber. natuurf. Ges. Rostock* 1.

344 WALDEYER 1871. Stricher's Handb. der Lehre von den Geweben des Menschen und der Tiere.
345 WALDEYER 1882 Untersuchungen über die Histogenese der Horngebilde, insbesondere der Haare und Feder. *Festschr. f. Henle. Beiträge z. Anat. u Entw.*

346 Walker, Tozer 1909. Observations on the history and possible function of the nucleoli in the vegetative cells of various animals. *Quart. Journ. of exp. Physiol.* 2.
347 Walterhöfer 1918. Veränderungen an infizierten Erythrocyten bei malaria tertiana und tropica. *Deutsch. med. Woch.* N°. 39.
348 Wassilieff 1907. Die Spermatogenese von Blatta germanica. *Arch. f. mikr. Anat.* 70.
349 Weidenreich 1900. Ueber Bau und Verhornung der menschlichen *Oberhaut Arch. f. mikr. Anat.* 56.
350 Weidenreich 1903. Das Schicksal der roten Blutkörperchen im normalen Organismus. *Anat. Anz.* 24.
351 Weidenreich 1903. Die roten Blutkörperchen I. *Ergebn. Anat. u. Entw.* 13.
352 Weidenreich 1904. Die roten Blutkörperchen II. *Ergebn. Anat. u. Entw.* 14.
353 Weidenreich 1905. Einige Bemerkungen über die roten Blutkörperchen. *Anat. Anz.* 27.
354 Weidenreich 1907. Zentrosomen oder Kernreste in den Erythrocyten des normalen strömenden Blutes? *Arch. f. Hyg.* 63.
355 Weidenreich 1908. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Leukoten. *Arch. f. mikr. Anat.* 72.
356 Weidenreich 1908. Zur Kenntnis der Zellen mit basophilen Granulationen im Blute und Bindegewebe. *Fol. Haem.* 5.
357 Weimann 1924. Studien am Zentralnervensystem des Menschen mit der Mikrophotographie im ultravioletten Licht. *Klin. Woch.*
358 Weintraud 1893. Ueber morphologische Veränderungen der roten Blutkörperchen. *Virch. Arch.* 131.
359 Weisman, Ischikawa 1889. Ueber die Paracopulationszelle in Daphnidinei. *Zool. Jahrb. Abt. Anat.* 4.
360 Westphal 1880. Ueber Mastzellen. *Inaug. Diss.* (ook verschenen in Ehrlich: *Farbenanalyt. Untersuch.*).
361 Widal, Abrami, Brulé 1908. Diversité de types des hematies granuleuses. *Compt. rend. Soc. de Biol. I.*
362 Winkler, Schrötter 1890. Zur Eleidinfrage. Mitteil. Embr. Inst. Wien. 11.
363 Winiwarter 1925. Sécrétion nucléaire dans le canal déférent humain. *La Cellule* 36.
364 Witt 1890. Zur Theorie des Färbeprozesse. *Farbezeitung.*
365 Wright 1910. The histogenesis of blood plates. *Public of Massach. Hospit.*

366 Zacharias 1881. Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerne. *Bot. Zeitg.* 39.
367 Zacharias 1882. Ueber den Zellkern. *Bot. Zeitg.* 40.
368 „ 1883. Ueber Eiweisz, Nuklein und Plastin. *Bot. Zeitg.* 41.
369 „ 1885. Ueber den Nukleolus. *Bot. Zeitg.* 43.
370 „ 1896. Einige microchemische Untersuchungsmethoden. *Ber. deutsch. bot. Ges.* 14.

Plaat I.

De afbeeldingen, die hier volgen, zijn allen microphoto's naar praeparaten, behandeld volgens de methode van FEULGEN en ROSSENBECK.

FIG. 1. Kernen van gladde spiercellen uit den wand van een kikvorschdarm. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 2. Ovogoniën uit het ovarium van een kikvorsch. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 3. Kern van een spiercel van Helobdella Stagnalis. Hydrolyse gedurende 4 minuten bij 60° C. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 4. Hetzelfde praeparaat als van fig. 3. Hydrolyse gedurende 2 minuten bij 55° C. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 5. Karyorhectisch gedegenereerde bindweefselkern in een nier met onderbonden circulatie. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 6. Kerndegeneraties in een nier met onderbonden circulatie.
a) Karyorhexis.
b) Karyolysis en hyperchromatose.
Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

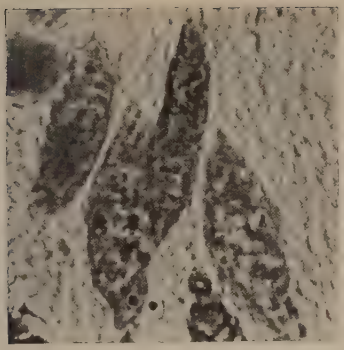


Fig. 1.

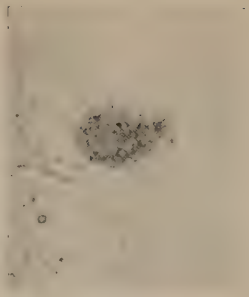


Fig. 3.

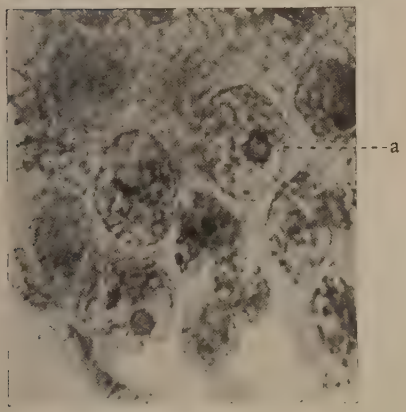


Fig. 2.

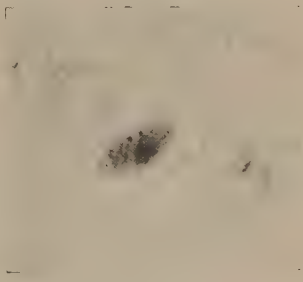


Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 6.

Plaat II.

FIG. 7. Kerndegeneraties in een nier met onderbonden circulatie; karyorhexis en karyolysis. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 8. Kerndegeneraties in een nier met onderbonden circulatie. Eenige chromatinekorrels zijn zichtbaar in een gedegenereerde kern, waarvan de kernmembraan nog intact is gebleven. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 9. Kerndegeneraties is een nier met onderbonden circulatie. De z.g. „Sprossungsfigur" is hier zichtbaar. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 10. Karyorhectisch gedegenereerde kern van een wit bloedlichaampje, voorkomend in de buikholte van een rat. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 11. Gedegenereerde kernen in een sarcoom van een vogel. Seibert, homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 12. Kernwandhyperchromatose in een sarcoom van een vogel. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 4.

Fig. 7.

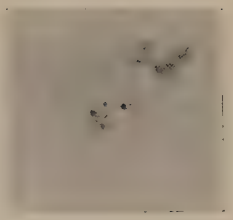


Fig. 8.

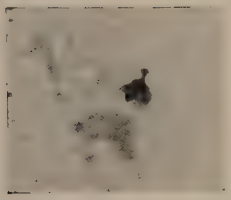


Fig. 9.

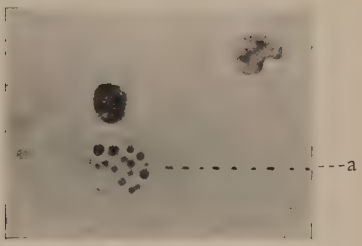


Fig. 10.

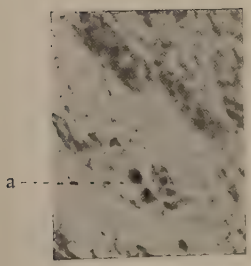


Fig. 11.

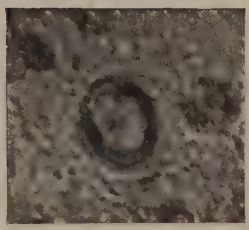


Fig. 12.

Plaat III.

FIG. 13. Praeputiaalklier van een muis.
a) normale kernen.
b) gedegenereerde kernen.
Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 2.

FIG. 14. Bekkenklier van Triton.
a) Aan die zijde der kern, welke naar het lumen is gericht, is geen kernmembraan te herkennen.
b en *c*) Chromatinedeeltjes, welke gedurende de secretie uit de kern worden gestooten. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 1.

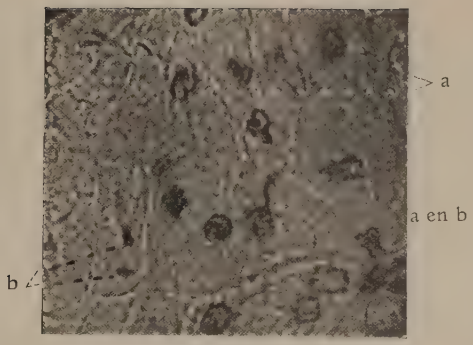


Fig. 13.

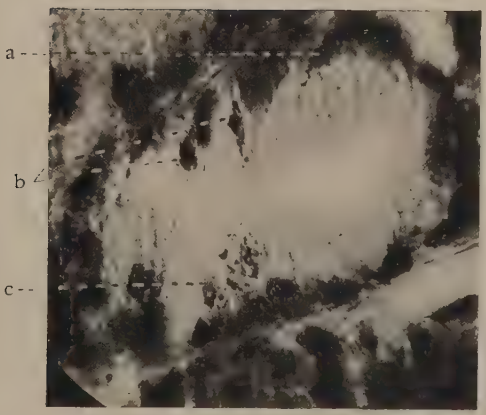


Fig. 14.

Plaat IV.

FIG. 15. Bekkenklier van Triton.
a en *b*) Aan die zijde der kern, welke naar het lumen is gericht, is de kernmembraan verdwenen.
c) Uitstooten van chromatinedeeltjes uit de kern gedurende de secretie.
Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

FIG. 16. Cel uit de cementklier van Scalpellum. De kern bestaat uit fijne chromatinekorrels; de kernmembraan is op sommige plaatsen verdwenen. Diffuse kleuring van het protoplasma. Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 1.

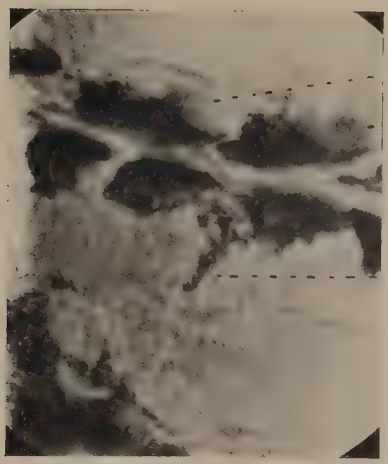


Fig. 15.

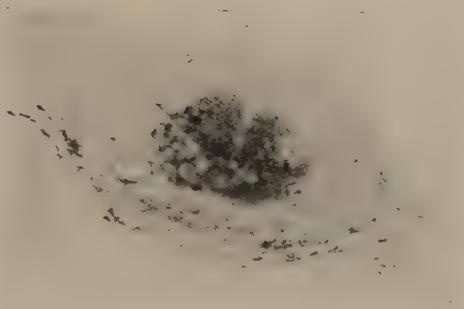


Fig. 16.

Plaat V.

FIG. 17. Cel uit de cementklier van Scalpellum.
a) groote holten in de kern.
b) overgang van chromatine uit de kern in het protoplasma.
c) chromatine in het protoplasma.
Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 1.

FIG. 18. Bindweefsel uit den oesophagus van een kikker.
a) Clasmatocyt met violet gekleurde korrels rondom de kern en in de uitloopers.
Seibert homog. imm. $^1/_{12}$, oc. 3.

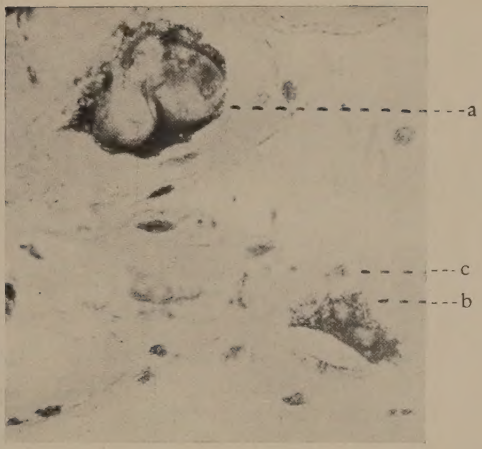


Fig. 17.

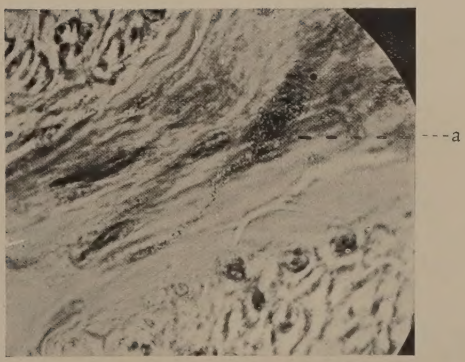


Fig. 18.